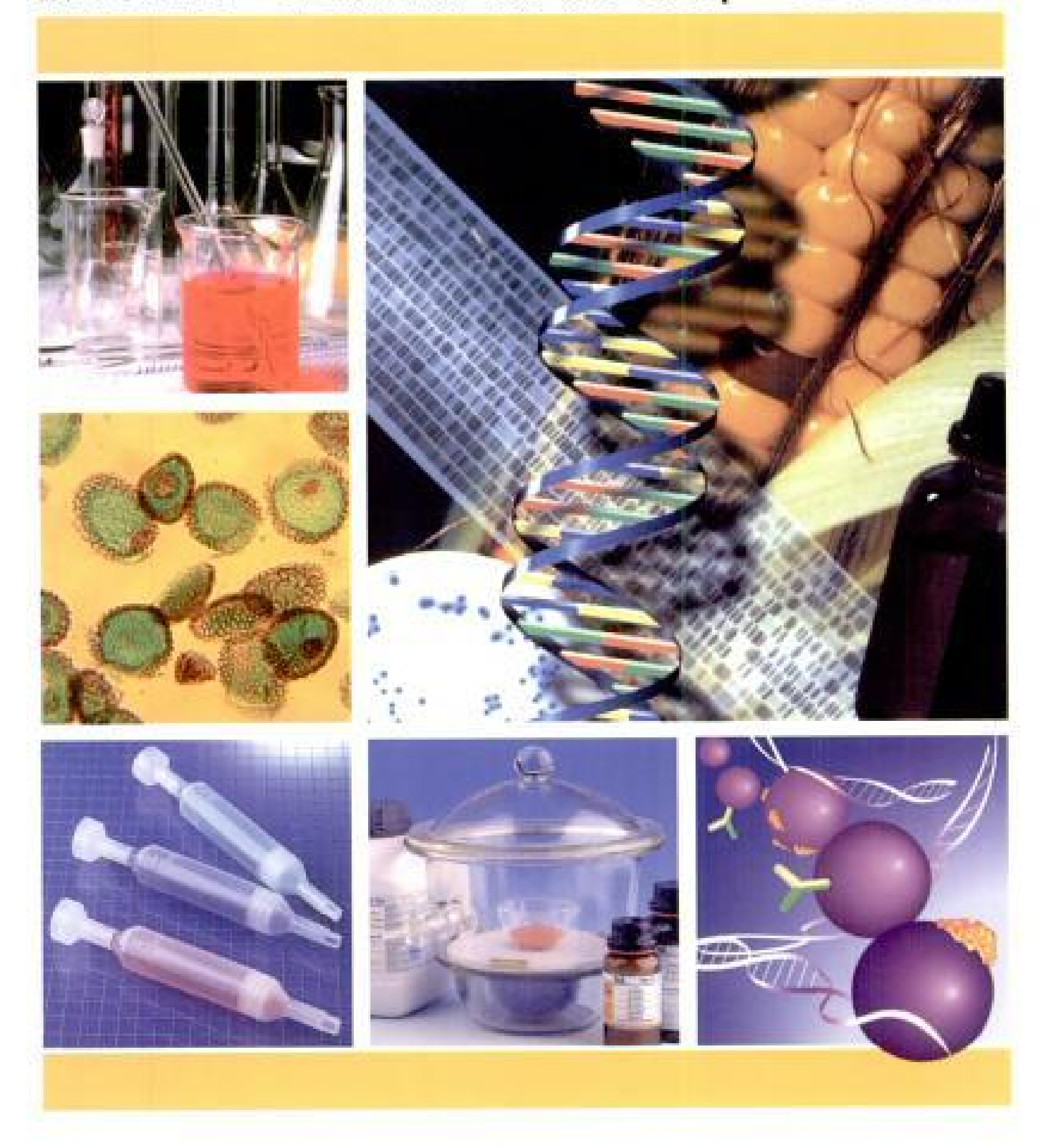
BIOSCIENCES ET TECHNIQUES

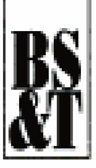
collection dirigée par J. Figarella, F. Zonszain

Expériences faciles et moins faciles en sciences biologiques

R. Perrier - T. Auffret van der Kemp - F. Zonszain



doin



BIOSCIENCES ET TECHNIQUES

Collection dirigée par J. Figarella, F. Zonszain

Expériences faciles et moins faciles en sciences biologiques

Robert Perrier

Professeur agrégé de biologie-géologie à l'ENCPB – Paris

Thierry Auffret van der Kemp

Chef du département des sciences de la vie,
délégué au monitorat d'enseignement supérieur au Palais de la Découverte – Paris

François Zonszain

Professeur agrégé honoraire de biochimie-génie biologique à l'ENCPB – Paris

doin éditeurs - paris

DOIN ÉDITEURS
BP 60
26, avenue de l'Europe
78141 Vélizy-Villacoublay Cedex

ISBN 2-7040-0860-4

Imprimé en France

Hidden page

La manipulation des produits chimiques nécessite que soient connues leurs précautions d'utilisation afin que le risque chimique soit maîtrisé. Le tableau ci-dessous décrit sous forme de pictogrammes les principales classes de dangers potentiels.

Symbole	Type de risque	Classement	Précautions
	E Explosion	Classification conforme aux résultats des tests allemands sur les explosions d'origine chimique	Eviter les chocs, les frictions, les étincelles, le feu et la chaleur
	O Oxydant, comburant	Classification conforme aux tests relatifs au risque d'inflammation et d'explosion	Eviter tout contact avec des substances inflammables
	F+ Extrêmement inflammable	Liquides dont le point éclair est inférieur à 0 °C et dont le point d'ébullition est au maximum de 35 °C. Gaz inflammables à pression et température ambiantes	Tenir éloigné des flammes, des étincelles et des sources de chaleur
	F Inflammable	Liquides dont le point éclair est inférieur à 25 °C, mais qui ne sont pas extrêmement inflammables. Solides qui peuvent s'enflammer facilement au contact d'une flamme ou d'un feu qui couve	Tenir éloigné des flammes, des étincelles et des sources de chaleur
	T+ Très toxique	Classification conforme aux résultats d'essais de toxicité aiguë par voie orale, par contact avec la peau, ou par inhalation, ou s'il y a des lésions sévères, éventuellement irréversibles, par absorption unique ou prolongée	Eviter tout contact avec le corps humain. Mention particulière d'une action cancérigène ou d'un risque d'altération héréditaire
	T Toxique	Idem	Idem
	Xn Nocif	Idem	Eviter tout contact avec le corps humain, y compris l'inhalation des vapeurs
	C Corrosif	Destruction du tissu total dans toute son épaisseur pour une peau intacte et saine	Eviter le contact avec les yeux, la peau et les vêtements. Ne pas inhaler les vapeurs
	Xi Irritant	Lésions nettes des yeux ou inflammation de la peau, subsistant après au moins 24 heures, ou irritation nette des voies respiratoires	Eviter le contact avec les yeux et la peau. Ne pas inhaler les vapeurs
	N Dangereux pour l'environnement	La diffusion dans l'environnement aquatique ou non peut provoquer immédiatement ou plus tard une altération de l'écosystème par une modification du foyer naturel	Eviter le rejet dans les canalisations, les sols ou l'environnement

La difficulté des expériences et la nécessité d'un matériel sophistiqué seront signalées par un logo :
- expérience simple à réaliser et ne nécessitant pas de matériel particulier ;
- expérience de difficulté moyenne ;
- expérience de réalisation délicate ou nécessitant un matériel spécialisé.

Remerciements

Les auteurs souhaitent remercier toutes les personnes qui ont aidé à la mise au point des expériences de ce livre, et plus particulièrement :
- Monsieur Yann Lefranc, chargé d'exposés du Palais de la Découverte ;
- Monsieur Robert Gaurenne, professeur de biologie et de géologie à l'école active bilingue ;
- Monsieur Philippe Lavaivre, chargé d'exposés du Palais de la Découverte ;
- Monsieur Yves Van Balthoven, technicien de laboratoire à l'Ecole Nationale de Chimie, Physique et Biologie de Paris ;
- Monsieur Jean-François Perrin, professeur agrégé de biochimie-génie biologique à l'Ecole Nationale de Chimie, Physique et Biologie de Paris ;
- Mademoiselle Isabelle Lasnier, maître auxiliaire à l'Ecole Nationale de Chimie, Physique et Biologie de Paris ;
- Monsieur Jean-Paul Larpent, professeur à l'université Blaise-Pascal, Clermont-Ferrand II ;
- Monsieur Daniel Charpentier, chef de travaux à l'Ecole Nationale de Chimie, Physique et Biologie de Paris ;
- Monsieur Patrick Vanneste, professeur agrégé de biochimie-génie biologique à l'Ecole Nationale de Chimie, Physique et Biologie de Paris.

Que soient également remerciés les directeurs des sociétés suivantes : MERCK, PROLABO et POLYLABO dont les encouragements et le soutien aux auteurs n'ont jamais fait défaut.

Sommaire

Partie I La chimie du vivant

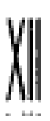
Partie II Enzymologie

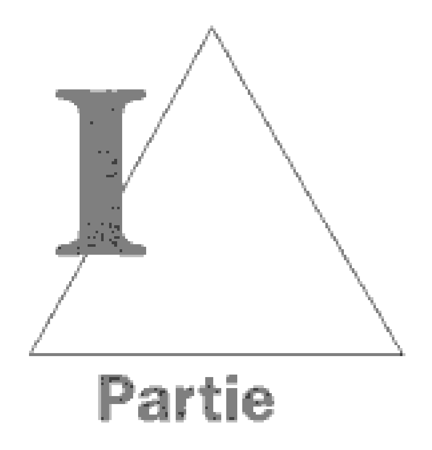
Partie III Microbiologie

Partie IV Cellules et tissus

Partie V Biologie animale

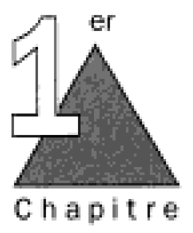
Partie VI Biologie végétale





Partie

La chimie du vivant



Les constituants minéraux de la matière vivante

Sommaire

Page



Détermination de la teneur en eau (et en matières volatiles) de graines oléagineuses Méthode de dessiccation par évaporation

Mots clés

Eau, dessiccation.

Principe

L'eau existe dans la matière vivante à des teneurs variant entre 10 et 99,5 %. Dans les tissus et les liquides biologiques, on trouve l'eau sous différentes formes :
- l'eau libre, exempte de liaisons avec les particules hydrophiles du milieu. Les molécules d'eau sont uniquement liées entre elles ;
- l'eau liée, engagée dans des liaisons avec les ions, molécules et macromolécules en solution et pseudosolution. La force de ces liaisons est variable et d'elle dépend l'importance du travail à fournir pour extraire l'eau.

La méthode de détermination de la teneur en eau la plus courante est la méthode par dessiccation-évaporation ; elle peut être pratiquée à chaud (étuve ou bain-marie) ou à froid (dessiccateur, vide sulfurique) lorsque les substances sont fragiles et altérables. S'il est aisé de vaporiser l'eau libre, l'eau liée est, en revanche, moins accessible à l'analyse. Un certain nombre d'erreurs sont systématiquement commises :
- une erreur par excès : des substances volatiles peuvent être vaporisées dans les conditions de la mesure ;
- une erreur par défaut : l'eau liée est d'autant moins vaporisable qu'elle est fortement engagée dans des liaisons avec les éléments hydrophiles du milieu ;
- un certain nombre de réactions chimiques peuvent se produire au cours de l'analyse et modifier la composition chimique de l'échantillon.

On procède à une dessiccation du produit à la température de 103 ± 2 °C, dans une étuve isotherme ventilée, à la pression atmosphérique, jusqu'à une masse pratiquement constante.
La teneur en eau et matière volatile est définie comme la perte de masse subie dans les conditions de la mesure.
Certains constituants fortement hygroscopiques rendent délicates les pesées à l'air libre par reprise rapide d'eau atmosphérique : il convient d'opérer dans un vase à tarer bouché émeri et, à défaut, dans un petit cristallisoir recouvert d'un verre de montre.

Sécurité

Il existe un risque exceptionnel de projection par surchauffe locale (nécessité de porter des lunettes de protection) et un risque de brûlure par un objet porté à 103 °C ; le vase à tarer doit être manipulé à l'aide d'une pince à creuset.

Matière d'œuvre

Matériel biologique

Petites graines telles que graines de lin ou de chènevis.

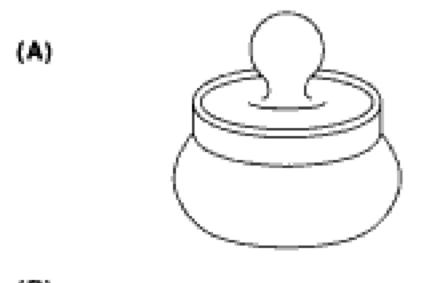
■ ***Matériel***

– Une étuve, ventilée de préférence, réglée à 103 °C.
– Un vase à tarer bouché émeri, à défaut un petit cristallisoir de 5 cm de diamètre recouvert d'un verre de montre.
– Une balance sensible au 1/10 de mg.
– Un dessiccateur.
– Une pince à creuset.

Mode opératoire

Les petites graines sont analysées sans broyage préalable, les plus grosses sont râpées ou broyées de manière à former des particules de 2 mm environ de diamètre.
Sécher, à l'étuve, le vase à tarer *(fig. 1.1)* 15 minutes à 103 °C, couvercle enlevé. Laisser refroidir au dessiccateur pendant 30 minutes, puis tarer le vase, couvercle posé (opérer par double pesée dans le cas de l'utilisation d'une balance à deux plateaux).
Placer dans le vase 5 g de graines entières ou de mouture. Répartir uniformément la substance sur le fond, fermer le vase, peser l'ensemble (utiliser la même tare dans le cas de l'utilisation d'une balance à deux plateaux).
Placer le vase contenant la substance à analyser, couvercle enlevé, dans l'étuve préalablement réglée à 103 ± 2 °C. Maintenir à cette température durant 3 heures, puis mettre en place rapidement le couvercle, refroidir l'ensemble au dessiccateur. Dès que le vase est refroidi, le peser.

(A)



(B)

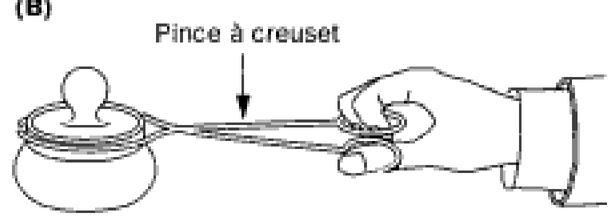


Figure 1.1. Mesure de la teneur en eau d'un échantillon biologique.
(A) Vase à tarer bouché émeri contenant le matériel biologique à analyser.
(B) Manipulation du vase à tarer à l'aide d'une pince à creuset.

Remettre l'ensemble, couvercle enlevé, à l'étuve 1 h durant et le peser à nouveau en opérant comme précédemment.
Si la différence entre les deux pesées n'excède pas 5 mg pour une prise d'essai de 5 g, considérer l'opération comme terminée.
Sinon, effectuer autant de séjours de 1 h à l'étuve qu'il est nécessaire pour que l'écart entre deux pesées successives soit inférieur ou égal à 5 mg.

Résultats, observations et interprétation

La masse d'eau contenue dans l'échantillon est égale à m_1 = (masse du vase + couvercle + échantillon frais) – (masse du vase + couvercle + échantillon déshydraté).
La masse de l'échantillon frais est égale à m_2 = (masse du vase + couvercle + échantillon frais) – (masse du vase + couvercle).
La teneur en eau et substances volatiles exprimée en pourcentage massique de substance brute est égale à :

$$\rho = \frac{m_1}{m_2} \times 100 \quad \text{(en g/100 g de substance brute}$$

2. Détermination de la teneur en cendres d'une feuille d'épinard

Mots clés

Cendres, incinération.

Principe

On appelle cendres l'ensemble des produits de l'incinération du résidu d'évaporation d'un échantillon biologique. On peut considérer que les cendres représentent effectivement la composition minérale de l'échantillon si l'on tient compte d'un certain nombre de facteurs correctifs :

- certains ions décomptés dans les cendres peuvent provenir d'éléments constituant la matière organique ;
- aux anions organiques minéralisés se substituent des anions carbonates ;
- des ions très volatils (halogénures) risquent d'être perdus au cours d'une incinération à température trop élevée, de même que des sels chauffés fortement risquent, après fusion, d'englober des particules carbonées.

Le mode opératoire préconisé permet d'obtenir la totalité des cations (ammonium exclu). La température d'incinération comprise entre 500 et 550 °C évite la volatilisation de certains sels et l'obtention de cendres blanches permet de contrôler l'absence de particules carbonées. Afin d'éviter l'influence du matériau constituant le récipient, il faudrait utiliser une capsule en platine. On comprendra que la capsule en nickel est d'un usage plus courant. Ce métal résiste bien aux températures élevées mais présente l'inconvénient de subir un début d'oxydation lorsqu'il est chauffé à une température supérieure à 500 °C.

Sécurité

Il existe un risque de brûlure par contact avec la capsule en nickel portée à 525 °C ; celle-ci doit être manipulée à l'aide d'une pince à creuset.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

Epinards.

■ ***Matériel***

- Une capsule de nickel de 70 mm de diamètre et de 25 mm de hauteur.
- Une balance sensible au 1/10 de mg.
- Un dessiccateur.
- Une plaque chauffante électrique.
- Un four électrique (aéré de préférence).

Mode opératoire

Chauffer pendant quelques minutes, au four électrique à 550 °C, la capsule de platine. Laisser refroidir au dessiccateur, tarer à l'aide d'une balance sensible au 1/10 de mg.

Disposer au fond de la capsule 20 g de feuille d'épinard, découpée en lamelles, et peser l'ensemble à l'aide de la même balance que celle qui a servi à tarer la capsule vide : soit m_1 la masse de l'échantillon d'épinard.

Placer la capsule dans le four électrique réglé à 105 °C pendant 4 heures puis dans le four réglé à 200 °C durant 30 minutes. La minéralisation s'effectue en portant la température du four à 525 ± 25 °C. Il ne doit pas y avoir d'inflammation du contenu de la capsule.
Après 5 minutes de carbonisation complète, retirer la capsule, laisser refroidir, ajouter 5 cm^3 d'eau, évaporer en portant au four à 105 °C (cette opération demande 1 heure environ), puis chauffer à nouveau à 525 °C. Si la combustion des particules carbonées n'est pas terminée en 15 minutes, recommencer la même opération : lavage, évaporation et calcination. Laisser refroidir dans un dessiccateur. Peser la capsule et les cendres : soit m_2 la masse de cendres.

Résultats, observations et interprétation

La teneur en cendres exprimée en g pour 100 g d'épinard est :

$$\rho = \frac{m_2}{m_1} \times 100 \quad \text{(en g/100 g de substance brute}$$

La teneur moyenne en cendres des feuilles d'épinard est égale à environ 2,5 % (m/m).

3. Mise en évidence et dosage du chlorure Méthode argentimétrique

3.1. Mise en évidence du chlorure dans un jus d'ananas

Mots clés

Chlorure, nitrate d'argent, ananas.

Principe

L'ion chlorure est mis en évidence par précipitation à l'état de chlorure d'argent par une solution de nitrate d'argent :

$$Ag^+ + Cl^- \rightarrow AgCl \nearrow$$

Le précipité de chlorure d'argent est blanc, à la différence des autres halogénures qui sont jaunes ou jaunâtres.
La recherche doit être réalisée en milieu neutre ou légèrement acide ; en milieu alcalin, il se forme un précipité noir d'oxyde d'argent ; le précipité de AgCl est photosensible, il noircit à la lumière.

Sécurité

L'acide nitrique est corrosif, il faut éviter le contact avec les yeux, la peau et les vêtements (port de lunettes, pas de pipetage à la bouche, port d'une blouse fermée de coton).
L'acide nitrique est placé dans la classe 2 de la classification toxicologique helvétique (poison très puissant).
Le nitrate d'argent, sel de métal lourd, est placé dans la classe 3 de la classification toxicologique helvétique (poison puissant), il est interdit de le pipeter à la bouche.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***
Une tranche d'ananas.

■ ***Réactifs***
– Une solution 1/10 mol/L d'acide nitrique.
– Une solution 1/100 mol/L de nitrate d'argent.

■ ***Matériel***
– Un presse-fruits.
– Deux tubes à hémolyse.
– Un tube à essais.
– Un dispositif de filtration sur gaze et sur papier.
– Un compte-gouttes.

Mode opératoire

Eplucher la tranche d'ananas, puis la passer au presse-fruits afin d'en exprimer le maximum de jus.
Filtrer le jus d'ananas en plusieurs étapes, sur gaze puis sur papier filtre, recueillir le filtrat dans un tube à essais.
Réaliser un essai et un témoin.

Essai : à l'aide du compte-gouttes verser 10 gouttes de jus d'ananas clair dans un tube à hémolyse, ajouter 1 goutte d'acide nitrique 1/10 mol/L puis 10 gouttes de solution de nitrate d'argent 1/100 mol/L.
Témoin : verser 10 gouttes de jus d'ananas clair dans un tube à hémolyse, ajouter 11 gouttes d'eau distillée.

Résultats, observations et interprétation

L'apparition d'une légère opalescence dans l'essai devenant, après un temps variable de quelques minutes à quelques dizaines de minutes, un précipité blanc qui noircit, nettement visible par rapport au témoin, indique la présence de l'ion chlorure dans le jus d'ananas.

3.2. Dosage du chlorure d'une feuille d'épinard selon la méthode de Charpentier-Volhard

Mots clés

Chlorure, nitrate d'argent, épinard.

Principe

En présence d'un excès de nitrate d'argent, le chlorure est précipité à l'état de chlorure d'argent :

$$Ag^+ + Cl^- \rightarrow AgCl\nearrow$$

Ce précipité est spécifique des halogénures lorsqu'on opère en milieu nitrique, de nombreux sels d'argent étant solubles dans un tel milieu (oxalates, phosphates, etc.).
L'excès de nitrate d'argent est dosé par une solution titrée de thiocyanate :

$$Ag^+ + SCN^- \rightarrow AgSCN\nearrow$$

Le thiocyanate d'argent étant plus insoluble que le chlorure d'argent (produits de solubilité respectifs : 10^{-12} et 10^{-10}), il peut alors se produire le réaction :

$$AgCl\nearrow + SCN^- \rightarrow AgSCN\nearrow + Cl^-$$

Aussi doit-on réduire le temps de contact entre le précipité de chlorure d'argent et le thiocyanate en opérant rapidement et en agglomérant AgCl par agitation et chauffage au voisinage de l'ébullition ou par un réactif organique comme le nitrobenzène.

Sécurité

L'acide nitrique 1 mol/L est corrosif, il faut éviter le contact avec les yeux, la peau et les vêtements (port de lunettes, pas de pipetage à la bouche, port d'une blouse fermée de coton).
L'acide nitrique est placé dans la classe 2 de la classification toxicologique helvétique (poison très puissant).
Le nitrate d'argent, sel de métal lourd, est placé dans la classe 3 de la classification toxicologique helvétique (poison puissant), il est interdit de le pipeter à la bouche. Il en est de même du thiocyanate d'ammonium également placé dans la classe 3.

Matière d'œuvre

■ *Matériel biologique*

Cendres issues de l'incinération de feuilles d'épinard.

■ *Réactifs*

- Acide nitrique concentré (d = 1,38).
- Solution saturée d'alun de fer et d'ammonium [ammonium-fer (III) sulfate dodécahydraté].
- Solution titrée de nitrate d'argent de concentration molaire volumique exactement connue, voisine de 0,01 mol/L. Cette solution peut être étalonnée selon la méthode de Mohr.
- Solution environ 0,01 mol/L de thiocyanate d'ammonium.

■ *Matériel*

- Une poire d'aspiration.
- Une fiole jaugée de 50 cm^3.
- Une fiole erlenmeyer de 250 cm^3.
- Une pipette jaugée 2 traits de 5 cm^3.
- Une pipette jaugée 2 traits de 10 cm^3.
- Une poire d'aspiration.
- Une éprouvette de 10 cm^3.
- Une burette de 25 cm^3 graduée au 1/10 de cm^3.

Mode opératoire

■ *Reprise des cendres issues de l'incinération de feuilles d'épinard par l'acide nitrique*

Reprendre les cendres par 25 cm^3 d'acide nitrique de concentration molaire volumique environ 1 mol/L, agiter jusqu'à dissolution totale.

Transvaser dans une fiole jaugée de 50 cm^3, y ajouter les eaux de rinçage, ajuster à 50 cm^3 avec de l'eau distillée. S'il subsiste, malgré tous les efforts faits pour obtenir une dissolution totale, quelques particules en suspension, filtrer.

■ *Essai*

Dans une fiole erlenmeyer de 250 cm^3, introduire successivement :

- x = 5* cm^3 de solution nitrique de cendres ;
- 50 cm^3 d'eau distillée ;
- 5 cm^3 d'acide nitrique concentré ;
- 2 à 3 cm^3 de solution saturée d'alun de fer et d'ammonium ;
- 10 cm^3 de solution de nitrate d'argent de titre exact et connu (voisin de 0,01 mol/L).

Titrer par la solution de thiocyanate d'ammonium de concentration molaire volumique voisine de 0,01 mol/L, jusqu'à teinte « chamois ».

* Cette valeur x de la prise d'essai a été déterminée expérimentalement, elle peut être augmentée ou diminuée selon la teneur de la feuille d'épinard en chlorure. Elle doit être ajustée de façon à obtenir une différence de chute de burette entre l'essai et le témoin supérieure à 2 cm^3 de solution de thiocyanate.

■ *Témoin*

Dans une fiole erlenmeyer de 250 cm^3, introduire :

- 10 cm^3 de solution de nitrate d'argent de titre exact et connu (voisin de 0,01 mol/L) ;
- 50 cm^3 d'eau distillée ;
- 5 cm^3 d'acide nitrique concentré ;
- 2 à 3 cm^3 de solution saturée d'alun de fer et d'ammonium.

Titrer par la solution de thiocyanate d'ammonium.

Résultats, observations et interprétation

Soit :

– x la prise d'essai de solution nitrique de cendres.
– V_1 la chute de burette de l'essai.
– V_2 la chute de burette du témoin.
– C_{Ag^+} la concentration molaire volumique exacte de la solution de nitrate d'argent (voisine de 0,01 mol/L).
– m_1 la masse d'épinard pesée lors de la détermination des cendres.
– ρ_{Cl^-} la teneur en chlorure exprimée en g pour 100 g d'épinards.

La teneur en chlorure des feuilles d'épinard est donnée par la formule littérale suivante :

$$\rho_{Cl^-} = \frac{C_{Ag^+}}{x} \times \left(1 - \frac{V_1}{V_2}\right) \times 35,5 \times \frac{50}{m_1} \quad \text{(en g de } Cl^-/100 \text{ g d'épinards)}$$

Conclusion

Il serait intéressant de pratiquer ce dosage sur plusieurs échantillons d'épinard d'origines différentes, afin de démontrer que la teneur en chlorure n'est pas une constante et dépend de la nature du sol sur lequel a poussé cette plante.

La teneur moyenne est de 5.10^{-2} g de chlorure pour 100 g d'épinards frais.



4. Mise en évidence et dosage des phosphates Formation d'un complexe phosphomolybdique

4.1. Mise en évidence des phosphates dans un jus d'ananas par la réaction de Misson

Mots clés

Phosphates, réaction de Misson, ananas.

Principe

En présence d'une solution acide de molybdate et de vanadate d'ammonium, les orthophosphates conduisent à la formation d'un complexe jaune intense, le complexe phosphovanadomolybdique. On opère en milieu nitrique ou chlorhydrique 0,5 à 0,9 mol/L.

Sécurité

L'acide nitrique et l'acide chlorhydrique sont corrosifs et irritants, il faut éviter le contact avec les yeux, la peau et les vêtements (port de lunettes, pas de pipetage à la bouche, port d'une blouse fermée de coton).
Ces deux acides sont placés dans la classe 2 de la classification toxicologique helvétique (poisons très puissants).
Le molybdate d'ammonium (ammonium heptamolybdate tétrahydraté) est relativement peu toxique (classe 4 de la classification toxicologique helvétique).
Le monovanadate d'ammonium est toxique et irritant et placé dans la classe 3 de la classification toxicologique helvétique : éviter le contact avec les yeux, la peau et la bouche.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***
Une tranche d'ananas.

■ ***Réactifs***
Réactif nitrovanadomolybdique :
- *Solution a* : dissoudre 40 g de molybdate d'ammonium (ammonium heptamolybdate tétrahydraté) dans 400 cm^3 d'eau distillée.
- *Solution b* : dissoudre 1 g de vanadate d'ammonium dans 300 cm^3 d'eau distillée et 200 cm^3 d'acide nitrique concentré.
- *Solution prête à l'emploi* : dans une fiole de 1 litre, verser d'abord la solution b puis la solution a, compléter à 1 litre et laisser vieillir huit jours avant utilisation.

■ ***Matériel***
- Un presse-fruits.
- Deux tubes à hémolyse.
- Un tube à essais.
- Un compte-gouttes.
- Un dispositif de filtration sur gaze et sur papier *(fig. 1.2)*.

Mode opératoire

Eplucher la tranche d'ananas, puis la passer au presse-fruits afin d'en exprimer le maximum de jus.
Filtrer le jus recueilli en plusieurs étapes, d'abord sur gaze, puis sur papier filtre, recueillir le filtrat dans un tube à essais.
L'expérience est faite comparativement à un témoin.
Essai : à l'aide du compte-gouttes verser 10 gouttes de jus d'ananas clair dans un tube à hémolyse, ajouter 10 gouttes d'eau distillée puis 5 gouttes de réactif nitrovanadomolybdique.
Témoin : introduire dans un tube à hémolyse : 10 gouttes de jus d'ananas et 25 gouttes d'eau distillée.
L'apparition d'une coloration jaune vif dans l'essai indique la présence d'ions orthophosphate.

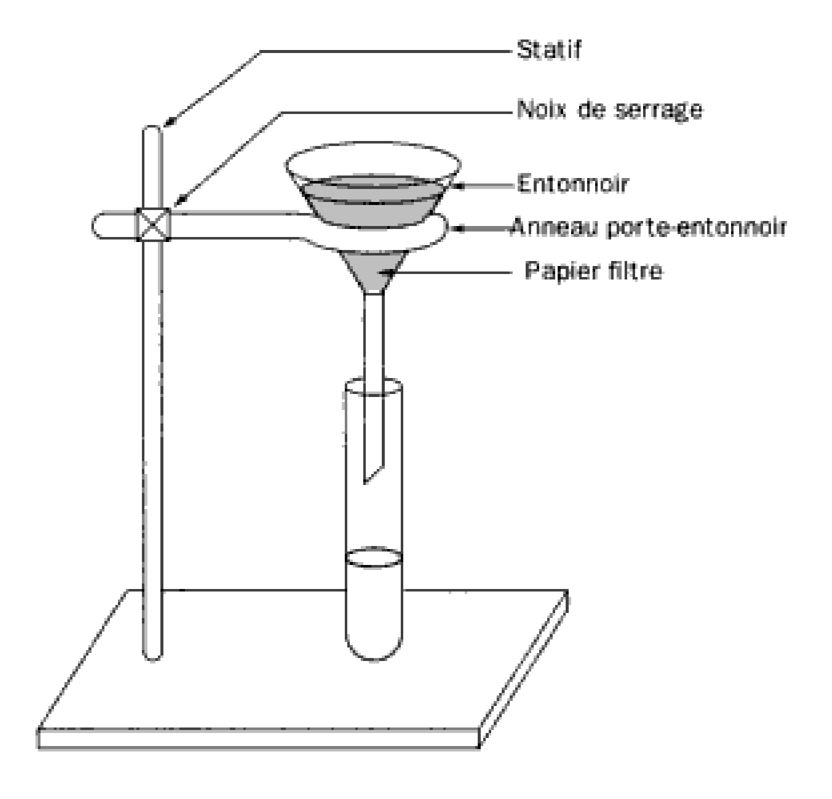


Figure 1.2. Dispositif de filtration (sur papier).

4.2. Dosage des phosphates d'une feuille d'épinard selon la méthode de Briggs

Mots clés

Phosphates, méthode de Briggs, épinards.

Principe

Les phosphates de la matière vivante se trouvent essentiellement à l'état minéral d'orthophosphates : HPO_4^{2-} et $H_2PO_4^-$ et à l'état organique sous forme d'esters phosphoriques d'oses (glucose-1-phosphate, glucose-6-phosphate, fructose-6-phosphate, fructose 1-6 diphosphate, etc.), sous forme de phosphoglycolipides, sous forme d'acides nucléiques, etc.
Le dosage des phosphates à partir des cendres d'un végétal comme l'épinard permet d'évaluer le « phosphore total » qui comptabilise à la fois le phosphore minéral et le phosphore organique.
La méthode de Briggs se caractérise par la formation d'un complexe coloré bleu obtenu par réduction du complexe phosphomolybdique. Dans certaines conditions, l'intensité de coloration, appréciée par la mesure de l'absorbance, est proportionnelle à la concentration de phosphate.
En présence d'un excès de réactif molybdique (solution acide molybdate d'ammonium), les orthophosphates conduisent à la formation d'un complexe phosphomolybdique $H_3PO_4^- (MoO_3)_{12}$.
Par addition d'un réducteur, le complexe est réduit en complexe phosphomolybdeux-molybdique $H_3PO_4^- [(MoO_3)_4MoO_2]_2$.

Ce composé est stable, soluble dans l'eau et intensément coloré en bleu (le maximum d'absorption se situe vers 830 nm). A de faibles concentrations en phosphates, l'absorbance suit la loi de Beer-Lambert, ce qui permet un dosage colorimétrique.

Sécurité

L'acide sulfurique est corrosif et irritant, il est placé dans la classe 1 de la classification toxicologique helvétique (poison très puissant) ; le réactif sulfomolybdique ne doit pas être pipeté à la bouche, et ne doit pas entrer en contact avec la peau et les yeux. Sa manipulation doit se faire avec des lunettes et exige le port d'une blouse en coton.
Le molybdate d'ammonium (ammonium heptamolybdate tétrahydraté) est relativement peu toxique (classe 4 de la classification toxicologique helvétique).
Le sulfite de sodium, considéré comme un poison puissant, est placé dans la classe 3 de la classification toxicologique helvétique.
Il en est de même de l'hydroquinone qui est un composé nocif, également placé dans la classe 3 de la classification toxicologique helvétique.
Le dihydrogénophosphate de potassium est un produit peu dangereux (classe 5 de la classification toxicologique helvétique).

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

Solution nitrique des cendres de feuille d'épinard préparée au cours de l'expérience « Dosage du chlorure de la feuille d'épinard selon la méthode de Charpentier-Volhard » (voir I.1.3.2).

■ ***Réactifs***

- Réactif sulfomolybdique : molybdate d'ammonium (ammonium heptamolybdate tétrahydraté) 25 g, eau distillée 125 cm^3, dissoudre, tiédir éventuellement, laisser refroidir et ajouter : eau distillée 125 cm^3, acide sulfurique pur 75 cm^3 ; agiter.
- Solution de sulfite de sodium à 200 g/L. Conserver en flacon bien bouché. A renouveler fréquemment.
- Solution d'hydroquinone à 10 g/L (on peut retarder l'oxydation par l'addition de 4 gouttes d'acide sulfurique concentré. Malgré cela, cette solution se conserve mal et il convient de la renouveler dès qu'un jaunissement apparaît). La préparer extemporanément.
- Solution étalon de phosphate à 1 g/L de phosphore : solution de KH_2PO_4 à 4,394 g/L.
- Solution étalon fille à 20 µg de phosphore par cm^3 : cette solution est préparée par dilution quantitative au 1/50 de la solution étalon mère.

■ ***Matériel***

- Une pipette jaugée 2 traits de 2 cm^3 (2 cm^3 est le volume de la prise d'essai de solution nitrique de feuille d'épinard diluée au 1/10, ce volume peut varier en fonction de la teneur en phosphate de la feuille d'épinard).
- Une pipette graduée de 5 cm^3.
- Une pipette graduée de 10 cm^3.
- Une poire d'aspiration.
- Quatre pipettes jaugées de 1 cm^3.
- Une fiole jaugée de 10 cm^3.
- Un spectrophotomètre ou un colorimètre.
- Des cuves de spectrophotométrie à usage unique.

Mode opératoire

Diluer au 1/10 la solution nitrique des cendres de feuille d'épinard préparée au cours de l'expérience « Dosage du chlorure d'une feuille d'épinard selon la méthode de Charpentier-Volhard » (voir I.1.3.2).
Réaliser en même temps la gamme d'étalonnage et les essais comme il est indiqué dans le *tableau 1.I*.

Tableau 1.I Tableau colorimétrique.

Tube n°	0 (Blanc)	1	2	3	4	5	Essai 1	Essai 2
Solution étalon fille de phosphate à 20 µg de P/cm^3 (en cm^3)	0	1	2	3	4	5		
Eau distillée (en cm^3)	6	5	4	3	2	1	4	4
Solution nitrique des cendres de feuille d'épinard diluée au 1/10 (en cm^3)							2*	2*
Réactif molybdique (en cm^3)	1	1	1	1	1	1	1	1
Hydroquinone à 10 g/L (en cm^3)	1	1	1	1	1	1	1	1
Sulfite de sodium à 200 g/L (en cm^3)	1	1	1	1	1	1	1	1
Quantité de phosphore en µg/tube	0	20	40	60	80	100		
Absorbance mesurée à 700 nm	0							

* La solution nitrique des cendres de feuille d'épinard est celle préparée au cours de l'expérience « Dosage du chlorure d'une feuille d'épinard selon la méthode de Charpentier-Volhard ». La prise d'essai de 2 cm^3 de cette solution diluée au 1/10 peut varier selon la teneur en phosphates de l'épinard.

Après 30 minutes de repos, mesurer l'absorbance de chacun des tubes contre le blanc à 700 nm.

Résultats, observations et interprétation

Construire la courbe d'étalonnage sur papier millimétré (absorbances en ordonnées, quantités de phosphore en µg/tube en abscisses).
Déterminer à l'aide de cette courbe la quantité de phosphore contenue dans l'essai. Soit cette quantité q en µg. La teneur massique du phosphore en mg pour 100 g d'épinard est :

$$\rho_P = \frac{q \times 50}{x \times m_1}$$

x représente la prise d'essai de solution nitrique des cendres de feuille d'épinard diluée au 1/10.



5. Mise en évidence et dosage du fer



5.1. Mise en évidence du fer dans un muscle rouge de vertébré, méthode au ferrocyanure ferrique (bleu de Prusse)

Mots clés

Muscle, fer, myoglobine, bleu de Prusse.

Principe

Le muscle rouge contient une protéine porphyrinique appelée myoglobine contenant du fer. Comme l'hémoglobine, la myoglobine renferme un chélat porphyrine-fer. La mise en évidence du fer se fait après rupture du complexe par l'acide chlorhydrique. Les ions ferriques donnent, en milieu acide, un complexe bleu de ferrocyanure ferrique (bleu de Prusse) avec le ferrocyanure de potassium.

Sécurité

L'acide chlorhydrique doit être manipulé avec beaucoup de précautions, il est corrosif et irritant, il est placé dans la classe 2 de la classification toxicologique helvétique. Le ferrocyanure de potassium [potassium hexacyanoferrate (II)] est peu toxique, il est placé dans la classe 4.

Matière d'œuvre

■ ***Matière biologique***
Un morceau de muscle rouge (un dé de 1 cm^3).

■ ***Réactifs***
- Acide chlorhydrique pur pour analyses (exempt de fer).
- Solution de ferrocyanure de potassium [potassium hexacyanoferrate (II) trihydraté] à 10 g/L.

■ ***Matériel***
- Un mortier.
- Sable de Fontainebleau lavé aux acides.
- Trois pipettes compte-gouttes.
- Deux pipettes de 2 cm^3.
- Une poire d'aspiration.
- Un tube à essais.
- Un dispositif de filtration sur coton.
- Deux tubes à hémolyse.

Mode opératoire

Broyer le morceau de muscle rouge en présence de sable de Fontainebleau lavé aux acides jusqu'à obtention d'un purée de muscle. Ajouter 4 cm^3 d'acide chlorhydrique pur pour analyses, mélanger, diluer par 4 cm^3 d'eau distillée. Filtrer sur coton.
L'expérience est faite comparativement à un témoin.
Essai : introduire, dans un tube à hémolyse, 10 gouttes d'extrait chlorhydrique de broyat de muscle et 10 gouttes de solution de ferrocyanure de potassium.

Témoin : introduire dans un tube à hémolyse 2 gouttes d'acide chlorhydrique, 8 gouttes d'eau distillée et 10 gouttes de solution de ferrocyanure de potassium.

Résultats, observations et interprétation

L'apparition d'une coloration bleue de ferrocyanure ferrique dans l'essai caractérise la présence de fer.

5.2. Dosage de l'hémoglobine du sang par dosage du fer total sanguin (méthode au thiocyanate)

Mots clés

Hémoglobine, fer, thiocyanate d'ammonium.

Principe

L'hémoglobine sert au transport de l'oxygène dans le sang, elle peut s'unir réversiblement à l'oxygène. Sa masse moléculaire est égale à 64 450 daltons, elle est constituée de 4 sous-unités : 2 chaînes α et 2 chaînes β. Chaque sous-unité comporte une partie protéique (la globine) et un groupement prosthétique (l'hème) constitué d'une porphyrine chélatant un atome de fer(II).

L'hémoglobine contient quatre atomes de fer Fe(II) par molécule, la dénaturation acide de la protéine libère le fer qui s'oxyde spontanément à l'état ferrique.

L'hémoglobine obtenue par hémolyse du sang de cheval dans l'eau distillée est minéralisée par voie humide selon la technique de Laudat (minéralisation nitro-permanganique). Le fer Fe(III) ainsi libéré est dosé par colorimétrie selon la méthode au thiocyanate. Les ions ferriques donnent en milieu acide des complexes rouges avec l'ion SCN^-. On opère en milieu alcoolo-acétonique, milieu apolaire qui renforce et stabilise la coloration :

$$Fe^{3+} + n\ SCN^- \rightarrow [Fe(SCN)_n]^{3-n} \quad (\text{avec } 1 < n < 6)$$

C'est du rapport des concentrations en ions Fe^{3+} et SCN^- que dépendra la nature du complexe :

– aux faibles concentrations de SCN^-, il y a formation du complexe $[Fe(SCN)]^{2+}$;
– aux moyennes concentrations, c'est le complexe $[Fe(SCN)_3]$ qui apparaît ;
– aux fortes concentrations c'est le complexe $[Fe(SCN)_6]^{3-}$ qui se forme.

L'intensité de la coloration augmente avec n. Il convient donc d'ajouter aux solutions ferriques un excès de réactif au thiocyanate de manière à former le complexe $[Fe(SCN)_6]^{3-}$ dans tous les cas. Ce complexe présente en outre l'avantage d'être le plus stable de la série.

Il est nécessaire d'opérer en milieu acide pour éviter la précipitation de l'hydroxyde ferrique :

$$Fe^{3+} + 3\ H_2O \rightarrow Fe(HO)_3 + 3\ H^+$$

Sécurité

La minéralisation nitro-permanganique est délicate à mener sur le plan de la sécurité. Porter à ébullition un mélange de permanganate de potassium et d'acide nitrique exige que l'on prenne de sérieuses précautions : port de lunettes de protection, port d'une blouse de coton soigneusement fermée, manipulation du flacon d'acide nitrique avec beaucoup de précautions afin qu'il n'y ait aucun contact avec la peau.

Le sel de Mohr [ammonium-fer(II) sulfate hexahydraté $(NH_4)_2SO_4$, $FeSO_4$, $6H_2O$ est un poison puissant, placé dans la classe 3 de la classification toxicologique helvétique. Ne pas pipeter à la bouche. Il en est de même du thiocyanate d'ammonium (ammonium thiocyanate) composé nocif, placé dans la classe 3.
Acétone et alcool sont deux solvants peu toxiques, l'acétone est placé dans la classe 5 de la classification toxicologique helvétique, l'alcool (éthanol) n'y entre pas, mais ces deux solvants sont facilement inflammables et doivent être tenus à l'écart de toute flamme ou source de chaleur.

Matière d'œuvre

■ *Matériel biologique*

– Sang de cheval commercialisé en ampoules stériles par l'Institut Pasteur.

■ *Réactifs*

– Solution étalon de fer à 20 g/cm^3 : dans une fiole jaugée de 100 cm^3, dissoudre 1,404 g de sel de Mohr [ammonium-fer(II) sulfate hexahydraté [$(NH_4)_2SO_4$, $FeSO_4$, $6H_2O$]. Dans 20 cm^3 d'eau distillée, ajouter 5 cm^3 d'acide sulfurique concentré dilué au 1/5, puis du permanganate de potassium dilué (environ 0,01 mol/L), jusqu'à très légère coloration œillet rose. Compléter à 100 cm^3 avec de l'eau distillée. Cette solution contient 200 µg/cm^3 de fer. Par dilution quantitative au 1/10, on obtient une solution fille à 20 µg/cm^3 de fer.
– Solution alcoolo-acétonique de thiocyanate : dissoudre 150 g de thiocyanate d'ammonium (NH_4SCN), dans 75 cm^3 d'eau distillée, tiédir au bain-marie à 60 °C. Laisser refroidir, ajouter 400 cm^3 d'alcool à 90 % et 400 cm^3 d'acétone.
– Acide nitrique concentré.
– Solution saturée de permanganate de potassium.

■ *Matériel*

– Tubes à essais.
– Une pipette graduée de 5 cm^3.
– Une pipette graduée de 10 cm^3.
– Une poire d'aspiration.
– Un flacon muni d'un distributeur de 10 cm^3.
– Une fiole erlenmeyer de 250 cm^3.
– Une pipette à sang de 1 cm^3.
– Un bain-marie équipé d'un statif, d'une pince et d'une noix de serrage.
– Une fiole jaugée de 50 cm^3.

Mode opératoire

■ *Minéralisation*

Dans une fiole erlenmeyer de 250 cm^3, introduire :
– 20 cm^3 d'eau bidistillée ;
– 1 cm^3 de sang de cheval ;
– 6 cm^3 de solution saturée de permanganate de potassium ;
– 10 cm^3 d'acide nitrique.
Plonger au bain-marie bouillant jusqu'à décoloration (durée 30 minutes). Ajouter éventuellement quelques gouttes d'une solution saturée d'oxalate de sodium pour réduire le permanganate en excès. Laisser refroidir. Filtrer éventuellement. Transvaser quantitativement dans une fiole jaugée de 50 cm^3. Joindre les eaux de rinçage (eau bidistillée). Compléter à 50 cm^3.

■ ***Dosage colorimétrique***

Réaliser, dans les mêmes conditions, la gamme d'étalonnage et le dosage colorimétrique, selon le *tableau 1.II*.

Tableau 1.II Dosage colorimétrique.

Tube n°	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**Essai 1**	**Essai 2**
Solution étalon de fer à 20 µg/cm³ (en cm³)	0	0,5	1	1,5	2	3	4		
Solution diluée de minéralisat de sang (en cm³)								4	5
Eau distillée (en cm³)	10	9,5	9	8,5	8	7	6	6	5
Solution alcoolo-acétonique de thiocyanate (en cm³)	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Quantité de fer en µg/tube	0	10	20	30	40	60	80	q_1	q_2
Absorbance mesurée à 485 nm	0								

Agiter, lire l'absorbance de chaque tube au bout de 5 minutes (important, car la coloration évolue dans le temps), à 485 nm.

Résultats, observations et interprétation

Tracer la courbe d'étalonnage (A^{485} en ordonnées, quantité de fer en µg/tube en abscisses), en déduire la quantité de fer, exprimée en µg/tube, dans chacun des essais (q_1 et q_2).

Sachant qu'il y a 4 atomes de fer par molécule d'hémoglobine, il y a 4 × 55,85 g de fer pour 64 450 g d'hémoglobine, la teneur en fer de l'hémoglobine est donc :

$$\frac{100 \times 4 \times 55{,}85}{64\ 450} = 0{,}346\ \%$$

La teneur en hémoglobine est :

$$\rho_{Hb} = \frac{q_1 \times 0{,}5}{4 \times 0{,}346} \text{ g d'Hb pour } 100 \text{ cm}^3 \text{ de sang}$$

ou

$$\rho_{Hb} = \frac{q_2 \times 0{,}5}{5 \times 0{,}346} \text{ g d'Hb pour } 100 \text{ cm}^3 \text{ de sang}$$

6. Mesure du pH

Mots clés

pH, indicateurs colorés, pH-mètre.

Principe

Le pH est défini comme étant :

$$pH = -\log(H^+)$$

expression dans laquelle (H^+) représente la concentration molaire volumique en ions H^+ de la solution. H^+ représente l'ensemble des formes de protons dans la solution, quel que soit leur degré d'hydratation, la plus simple et la plus abondante étant H_3O^+.
La mesure du pH peut se faire par une méthode colorimétrique ou une méthode potentiométrique.

■ ***Méthode colorimétrique***

Elle est fondée sur l'utilisation d'indicateurs colorés acidobasiques, c'est-à-dire des composés organiques appartenant à des couples acide-base de pKA bien définis et pour lesquels la couleur de la forme acide est différente de celle de la forme basique.
Dans une solution de pH inconnu, l'addition d'une goutte de solution d'indicateur donnera une teinte qui dépend du pH.
Dans la pratique, on utilise des mélanges d'indicateurs ou des papiers imprégnés d'une série d'indicateurs et une échelle de teintes indiquant l'ordre de grandeur du pH.

■ ***Méthode potentiométrique***

Cette méthode est fondée sur la mesure d'une différence de potentiel entre deux électrodes :
- une électrode de référence dont le potentiel est constant, c'est généralement une électrode au calomel saturé ;
- une électrode indicatrice dont le potentiel dépend du pH. C'est généralement une électrode de verre dont le potentiel est égal à :

$$E_i = A + 0{,}06\ pH$$

La constante A varie d'une électrode à l'autre, ce qui explique la nécessité d'un étalonnage à l'aide d'une solution tampon.
Les électrodes de verre ordinaires sont utilisables pour des pH compris entre 1 et 12.
La mesure de la différence de potentiel entre l'électrode indicatrice de verre et l'électrode de référence au calomel est une fonction affine du pH :

$$U = E_i - E_{ref} = A + 0{,}06\ pH - E_{ref} = (A - E_{ref}) + 0{,}06\ pH$$

$$U = K + 0{,}06\ pH$$

Il existe des électrodes combinées où l'électrode de verre et l'électrode au calomel sont montées sur un même support.
La mesure de la différence de potentiel est faite grâce à un millivoltmètre gradué directement en unités pH.
Un potentiomètre « standardisation » ou « tarage » permet d'étalonner l'appareil pour une électrode de verre donnée.
La relation entre potentiel et pH faisant intervenir un coefficient dépendant de la température, certains appareils comportent un bouton permettant d'effectuer la correction de température.

6.1. Etude comparative du pH de différents milieux biologiques

Mots clés

pH, papier pH.

Principe

Grâce à du papier pH, en pratiquant des essais à « la touche », mesurer le pH de pulpes de végétaux, de tissus animaux, de liquides d'origine biologique et de différents sols *(fig. 1.3)*.

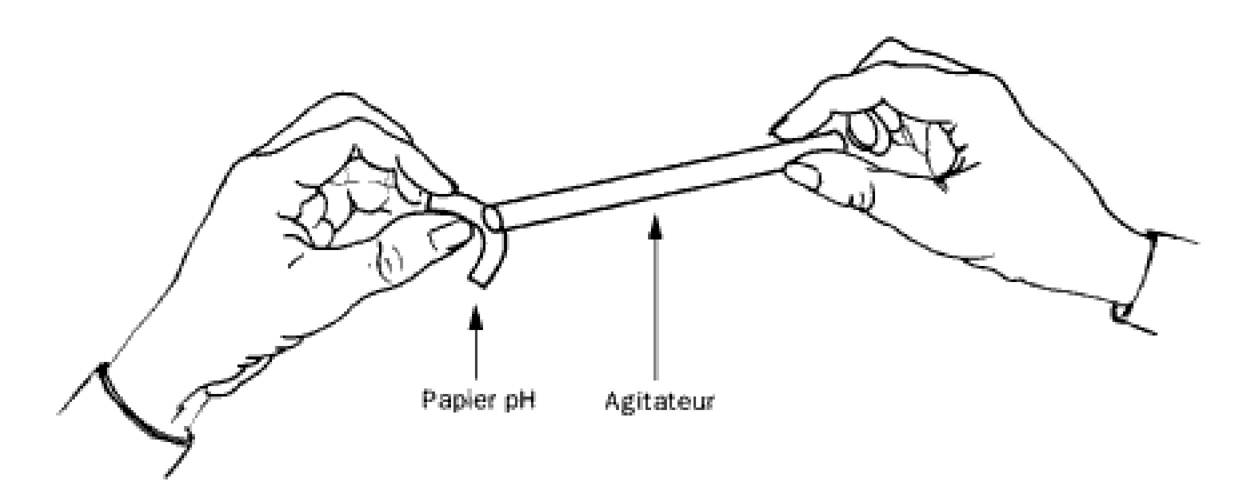


Figure 1.3. Essai à la touche avec du papier pH.

Sécurité

Sans danger.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

Echantillons de produits d'origine biologique, comme il est indiqué dans le mode opératoire.

■ ***Matériel***

- Papier pH, gamme 1 à 10, référence Merck : Indicateur universel, Art n° 1.09526.0001.
- Un mini-agitateur de verre (diamètre : 2 mm, longueur : 15 cm).
- Une plaque à godets *(fig. 1.4)*.

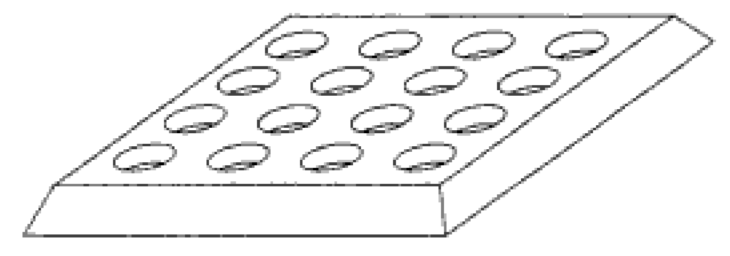


Figure 1.4. Plaque à godets.

Mode opératoire

Disposer dans les emplacements d'une plaque à godets :
- des fragments de végétaux :
  - un morceau de pulpe d'agrume (citron, pamplemousse, orange ou clémentine),
  - un morceau de fruit à noyau (cerise, abricot, pêche, etc.),
  - un morceau de pulpe de tomate,
  - etc. ;

– des fragments de tissus animaux :
  – un morceau de muscle rouge,
  – un morceau de foie,
  – un morceau de chair de poisson ;
– des petits échantillons de sol :
  – un peu de terre très calcaire,
  – un peu de terre argileuse ou schisteuse,
  – un peu d'humus ;
– des liquides d'origine biologique :
  – du vin blanc doux,
  – du vin blanc sec,
  – du vinaigre,
  – du cidre brut,
  – du lait frais cru,
  – du lait cru « tourné ».

Sur chacun des échantillons, faire une mesure du pH en pratiquant un essai à la touche.
L'extrémité du mini-agitateur, préalablement lavée à l'eau distillée et essuyée au papier joseph, est trempée dans l'échantillon si celui-ci est liquide. S'il est pâteux ou solide, le triturer avec l'agitateur pour en exprimer une gouttelette de jus.

Résultats, observations et interprétation

Regrouper tous les résultats dans un tableau.
Quelle gamme de pH a-t-on observée ?

Conclusion

Les pH acides et neutres sont plus fréquents que les pH alcalins dans la nature, pourquoi ?
Quelle remarque peut-on faire quant aux pH comparés des tissus animaux et végétaux ?
Quelle conclusion peut-on en tirer ?

6.2. Mesure de l'acidité totale d'un vin

Mots clés

Acidité totale, vin.

Principe

Par convention, l'acidité totale d'un vin est la somme des acidités titrables lorsque l'on amène le vin au pH 7 par addition d'une solution alcaline titrée. L'acidité du dioxyde de carbone (CO_2) et du dioxyde soufre (SO_2) n'est pas comprise dans l'acidité totale. De nombreux acides sont présents dans le vin, les acides acétique, tartrique, malique, citrique, etc.
Certains acides ne sont pas complètement salifiés à pH 7, ce sont des acides faibles dont la neutralisation ne survient que pour des pH supérieurs.
Ce que l'on mesure par cette méthode est une acidité de titration et non une acidité réelle.
Dans la pratique, la correction de SO_2 est négligeable dans le cas des vins rouges.

Sécurité

La solution d'hydroxyde de sodium est placée dans la classe 2 (poison très puissant) de la classification toxicologique helvétique. Il faut éviter tout contact avec la peau, les muqueuses et les yeux. Ne pas pipeter à la bouche.

Matière d'œuvre

Matériel biologique

Vin rouge.

Réactifs

- Solution d'hydroxyde de sodium environ 0,05 mol/L de titre connu (C_{OH^-}).
- Tampon pH 7 pour l'étalonnage du pH-mètre : phosphate monopotassique, 107,3 g ; hydroxyde de sodium 1 mol/L, 500 ml ; eau distillée qsp 1 litre.

Matériel

- pH-mètre.
- Burette.
- Pipette de 20 cm^3.
- Poire d'aspiration.
- Agitateur magnétique.
- Barreau aimanté.
- Fiole à vide.
- Trompe à vide.

Mode opératoire

Elimination du CO_2 (décarbonication)

Introduire du vin dans une fiole à vide. Boucher. Créer une dépression à l'aide d'une trompe à eau. Agiter jusqu'à ce que le vin ne mousse plus (1 à 2 minutes pour un vin rouge non gazéifié).

Dosage potentiométrique

Etalonner un pH-mètre et mettre en place une agitation magnétique. Introduire les électrodes dans une prise d'essai E = 20 cm^3 de vin décarboniqué. Verser une solution d'hydroxyde de sodium environ 0,05 mol/L (de titre exact C_{OH^-}) jusqu'à obtention d'un pH égal à 7. L'addition d'hydroxyde de sodium doit être réalisée lentement et sous agitation constante. Soit V la chute de burette obtenue en cm^3.

Résultats, observations et interprétation

Expression des résultats (le résultat est exprimé en millimoles d'ions H^+ par litre de vin) :

$$C = \frac{C_{OH^-} \times V \times 10^3}{E} \text{ mmol/L}$$



Les constituants glucidiques de la matière vivante

Sommaire

Page

1. Réactions de caractérisation des oses et osides

Mots clés

Oses, osides, pouvoir réducteur, réactions furfuraliques, réaction à l'iode, réaction à la glucose oxydase.

Sécurité

Cette manipulation comporte différentes opérations de chauffage. Il est indispensable d'éviter les phénomènes de surchauffe qui risquent de provoquer des projections brûlantes.
Les solutions cuivriques sont placées dans la classe 3 de la classification toxicologique helvétique (poison puissant). L'acide sulfurique y est placé dans la classe 1 (poison très puissant, à manipuler en portant des lunettes), l'hydroxyde de sodium dans la classe 2 (poison très puissant).
Le naphtol-1 est placé dans la classe 2, le résorcinol dans la classe 3 de cette même classification, l'orcinol non classé est cependant nocif.
En conclusion, il faut éviter toute projection et tout contact entre les réactifs et la peau, les muqueuses et les yeux.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

Glucose, fructose, saccharose, arabinose, miel, vin blanc doux, amidon, cerises ou prunes, gomme arabique, foie.

■ ***Réactifs***

Liqueur de Fehling

– solution cuivrique (A) :		
– $CuSO_4$, 5 H_2O pur p.a.	40	g
– H_2SO_4 pur	5	cm^3
– eau distillée qsp	1 000	cm^3
– solution tartro-sodique (B) :		
– tartrate double de potassium et de sodium (sel de Seignette)	200	g
– lessive de soude pure (d = 1,33)	375	cm^3
– eau distillée qsp	1 000	cm^3

Réactif de Molisch

– naphtol-1	2	g
– éthanol	100	cm^3

Réactif de Sélivanoff

– résorcinol pur	2	g
– HCl pur	33	cm^3
– eau distillée	100	cm^3

Réactif de Bial

– HCl pur	500	cm^3
– orcinol pur	1	g
– solution de perchlorure de fer (d = 1,26)	1,5	cm^3

Lugol (solution iodo-iodurée)

– iode	4	g
– iodure de potassium	8	g
– eau distillée qsp	1 000	cm^3

■ ***Matériel***
– Tubes à essais.
– Bec Bunsen.
– Pince en bois.
– Eprouvette de 10 cm^3.
– Pipette de 2 cm^3.
– Pipette compte-gouttes.
– Poire d'aspiration.

Mode opératoire

■ ***Les méthodes cuprimétriques***

En milieu alcalin et chaud, les oses et osides réducteurs présentent des propriétés réductrices vis-à-vis de l'ion cuivrique : Cu^{2+}. Les méthodes cuprimétriques sont fondées sur la réduction d'une liqueur cupro-alcaline :

$$Cu^{2+} + 2\ OH^- + 2\ e^- \rightarrow Cu_2O + H_2O$$

$$\text{Sucres réducteurs} \rightarrow \text{produits d'oxydation} + n\ e^-$$

L'oxyde cuivreux Cu_2O forme un précipité rouge brique.
La liqueur cupro-alcaline, appelée liqueur de Fehling, est un complexe cuivrique sous forme d'une solution contenant du sulfate de cuivre, de la soude, additionnée d'un complexant : le sel de Seignette ou tartrate double de sodium et de potassium dont le rôle est d'éviter la précipitation de l'hydroxyde cuivrique.
La réaction d'oxydation des glucides réducteurs est complexe et non stœchiométrique ; le résultat dépend des conditions opératoires.
Cette méthode de caractérisation n'est pas rigoureusement spécifique des glucides, de nombreuses substances réductrices non glucidiques réagissent également avec la liqueur de Fehling.
Dans un tube à essais, verser :
– 2 cm^3 de solution cuivrique (solution A de Fehling) ;
– 2 cm^3 de solution tartro-sodique (solution B de Fehling) ;
– 2 cm^3 de solution d'échantillon à analyser.
Porter à ébullition. Un précipité rouge brique d'oxyde cuivrique indique l'existence d'un pouvoir réducteur. Le surnageant reste bleu si la concentration du sucre réducteur est faible ; il devient incolore ou jaune si la concentration est élevée.

■ ***Les réactions basées sur les dérivés furfuraliques des oses***

En milieu fortement acide, à chaud, les oses possédant au moins 5 atomes de carbone sont déshydratés et transformés en furfural ou dérivés du furfural *(fig. 2.1)*.
• *Réaction de Molisch*
Cette réaction permet de caractériser la présence de n'importe quel glucide, ose ou oside. Le glucide est déshydraté, par l'acide sulfurique concentré, en un composé furfuralique qui se condense avec le naphtol-1 en un composé coloré en violet.
Dans un tube à essais, verser :
– 2 cm^3 d'échantillon glucidique à analyser ;
– 2 à 3 gouttes de réactif de Molisch ;
– 2 cm^3 d'acide sulfurique concentré, versé lentement, de manière que l'acide versé ne se mélange pas.
L'apparition d'un anneau violacé à l'interface révèle la présence d'un glucide en solution.
La réaction entre l'acide sulfurique et l'eau est suffisamment exothermique pour qu'il soit inutile de chauffer.

Aldopentose ⟶ $3H_2O$ + Furfural

Aldohexose ⟶ $3H_2O$ + 5 hydroxyméthyl-furfural

Figure 2.1. Exemples de réactions de déshydratation d'oses.

• *Réaction de Sélivanoff*

Cette réaction permet de caractériser les cétoses.

En milieu acide chlorhydrique dilué au 1/3, les cétoses sont plus rapidement déshydratés que les aldoses en dérivés furfuraliques. La réaction caractérise un cétose si elle se produit en moins de 5 minutes.

Les dérivés furfuraliques ainsi formés se condensent avec le résorcinol (méta-di-benzophénol) en donnant un composé rouge. Le produit formé précipite en milieu aqueux, mais est soluble dans l'alcool.

La réaction est positive avec les osides comportant un cétose dans leur molécule ; en effet ils subissent une hydrolyse dans les conditions de la réaction (milieu acide et à chaud).

Dans un tube à essais, verser :

– 2 cm^3 de solution de glucide à analyser ;

– 2 cm^3 de réactif de Sélivanoff.

Porter au bain-marie bouillant pendant 5 minutes. La réaction est positive quand il apparaît, après refroidissement, un précipité rouge, soluble dans l'alcool.

• *Réaction de Bial*

Cette réaction permet la différenciation des pentoses.

En milieu chlorhydrique concentré, les pentoses sont déshydratés et se condensent avec l'orcinol en développant une coloration verte ; la réaction est faite en présence d'ions ferriques.

Dans un tube à essais, verser 5 cm^3 de réactif de Bial (préparé au moment de l'emploi car ce réactif ne se conserve pas).

Porter au bain-marie bouillant et, immédiatement, ajouter 1 cm^3 de solution de glucide à analyser.

Une coloration verte, immédiate, indique la présence d'un pentose.

■ ***Les réactions à l'iode***

L'iode est adsorbé sur les polyosides formés de glucopyranoses liés en 1-4, à raison de 2 molécules d'iode par tour de spire.

La coloration obtenue est bleue avec l'amidon ou la cellulose, brun-acajou avec le glycogène ou une érythrodextrine.

Dans un tube à essai, verser :

– 2 cm^3 d'empois d'amidon, ou de solution colloïdale de glycogène ;

– quelques gouttes de lugol (solution iodo-iodurée).

Observer la coloration obtenue, qui disparaît au chauffage et réapparaît après refroidissement (déspiralisation des chaînes glucidiques à haute température).

Pour la cellulose insoluble, procéder de la manière suivante : placer, dans un verre de montre, un petit morceau de papier filtre sans cendres, ou un petit morceau de coton hydrophile ou un fragment de moelle de sureau ; verser dessus quelques gouttes de lugol (solution iodo-iodurée) et quelques gouttes d'acide sulfurique concentré, dilué au 1/2. Observer la coloration bleue.

■ ***Caractérisation du glucose par la méthode à la glucose-oxydase***

Le glucose est oxydé par l'oxygène dissous en acide gluconique, réaction catalysée par la glucose-oxydase (GOD) *(fig. 2.2)*.

Le peroxyde d'hydrogène formé H_2O_2 est caractérisé par une réaction indicatrice, catalysée par une peroxydase (POD).

$$H_2O_2 + \text{chromogène } (CH_2) \xrightarrow{\text{POD}} 2\ H_2O + \text{dérivé oxydé coloré (C)}$$

D-glucopyranose $+ O_2 \xrightarrow{\text{GOD}} H_2O_2 +$ D-gluconolactone

D-gluconolactone $+ H_2O \longrightarrow$ Acide gluconique

Figure 2.2. Réaction d'oxydation du D-glucose par l'oxygène, catalysée par la glucose-oxydase.

Les chromogènes sont des molécules incolores sous forme réduite et colorées sous forme oxydée. Il en existe de nombreuses : à titre d'exemple, l'orthodianisidine se colore en jaune après oxydation et l'orthotoluidine en bleu.
La réaction peut être pratiquée en phase liquide, mais il est beaucoup plus commode d'utiliser les bandelettes réactives servant à la recherche du glucose urinaire (Glucitest des laboratoires Ames), en vente dans toutes les pharmacies.
Le principe de ces bandelettes est le même que celui décrit ci-dessus, les réactifs sont adsorbés sur une petite pastille de papier. Il suffit de l'immerger dans la solution à analyser et d'observer la coloration. Il existe une adaptation qui permet d'évaluer la concentration de glucose en comparant la coloration obtenue avec une gamme de teintes étalonnées.

En appliquant les modes opératoires décrits ci-dessus, effectuer les caractérisations comme il est indiqué dans le *tableau 2.I*.

Tableau 2.I Tableau colorimétrique.

Echantillon à analyser	Liqueur de Fehling	Réaction de Molisch	Réaction de Sélivanoff	Réaction de Bial	Réaction à l'iode	Réaction à la glucose-oxydase
Solution de glucose à 5 g/L	X	X	X	X		X
Solution de fructose à 5 g/L	X	X	X	X		X
Solution de saccharose à 5 g/L	X (1)	X	X	X		X
Solution d'arabinose à 5 g/L	X	X	X	X		X
Solution de miel liquide à 25 g/L	X	X	X	X		X
Vin blanc doux	X	X	X			X
Empois d'amidon à 5 g/L	X (1)	X			X (2)	X
Hydrolysat acide de gomme arabique	X (3)	X		X	X	
Jus de cerise ou de prune	X	X	X	X	X	X
Macération de foie fraîchement prélevé et conservé dans la glace, incubé à 37 °C en milieu tampon phosphate pH 7 pendant 30 minutes						X

(1) Il arrive qu'il apparaisse une trace de précipité, conséquence des impuretés réductrices.
(2) Observer une coloration bleue à froid qui disparaît à chaud.
(3) En milieu alcalin, la gomme précipite, cela n'empêche pas de voir le précipité rouge d'oxyde cuivrique.

Résultats, observations et interprétation

Résumer sur un tableau les résultats de ces expériences, conclure et interpréter.



2. Application de la méthode de Fehling à l'étude de l'hydrolyse (inversion) du saccharose

Mots clés

Saccharose, hydrolyse, inversion, liqueur de Fehling.

Principe

La méthode de Fehling est fondée sur la détermination du volume de solution de sucres réducteurs à doser nécessaire pour réduire en totalité une prise d'essai de solution cupro-alcaline (liqueur de Fehling).
La liqueur de Fehling est étalonnée dans les mêmes conditions par une solution étalon de glucose.

$$2\ Cu^{2+} + 2\ OH^- + 2e^- \rightarrow Cu_2O \nearrow + H_2O$$

Pour pouvoir comparer les résultats de l'essai et du témoin, il faut opérer dans les mêmes conditions de durée, de température et de concentration.
L'hydrolyse enzymatique du saccharose est catalysée par une enzyme appelée saccharase ou invertase *(fig. 2.3)*.

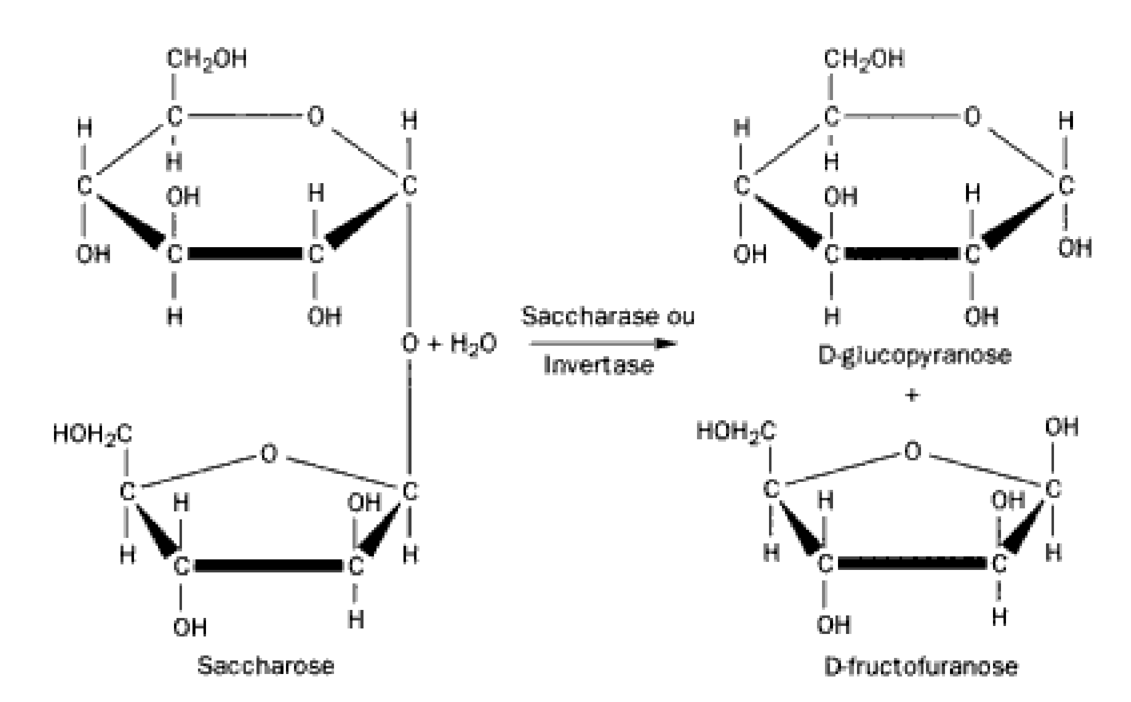


Figure 2.3. Réaction d'hydrolyse du saccharose.

La mise en évidence de la réaction d'inversion est fondée sur l'apparition de sucres réducteurs. Le saccharose, dioside non réducteur, est hydrolysé en D-fructofuranose et D-glucopyranose qui sont deux oses possédant le même pouvoir réducteur à l'égard de la liqueur de Fehling.

Sécurité

La manipulation présente un risque de projection si l'ébullition n'est pas rigoureusement contrôlée, il faut absolument éviter les surchauffes locales. Le port de lunettes de protection est conseillé.

La liqueur de Fehling ne doit pas être pipetée à la bouche, il faut éviter tout contact avec la peau, les muqueuses et les yeux. Les solutions cuivriques sont placées dans la classe 3 de la classification toxicologique helvétique (poison puissant) ; l'hydroxyde de sodium dans la classe 2 (poison très puissant).
L'acide trichloracétique est un produit dangereux et très corrosif, il est placé dans la classe 2 de la classification toxicologique helvétique. Le port des lunettes de protection est fortement conseillé.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***
Solution d'invertase : solution d'enzyme (enzyme Merck à 200 UI/mg) à 0,5 mg/cm^3 dans un tampon phosphate 0,025 mol/L, pH 7. (A conserver au froid [+ 4 °C].)

■ ***Réactifs***
– Solution étalon de glucose à 5 g/L (à conserver au froid [+ 4 °C]).
– Solution étalon de fructose à 5 g/L (à conserver au froid [+ 4 °C]).
– Solution de saccharose 0,6 mol/L.
– Tampon pH 4,7 :
  – acétate de sodium : 8,2 g/L,
  – acide acétique pur pour analyses : 5,8 cm^3/L.
– Liqueur de Fehling : (voir I.2.1)
  – solution A : solution cuivrique,
  – solution B : tartro-sodique.
– Acide trichloracétique à 60 g/L.

■ ***Matériel***
– Une burette de 25 cm^3 au 1/10 de cm^3.
– Deux fioles erlenmeyer de 100 cm^3.
– Une fiole erlenmeyer de 250 cm^3.
– Une pince en bois.
– Un bec Bunsen.
– Quelques grains de pierre ponce.
– Deux pipettes jaugées de 10 cm^3.
– Une pipette jaugée de 5 cm^3.
– Une poire d'aspiration.
– Une éprouvette de 10 cm^3.
– Un bain thermostaté réglable à 25 °C, équipé d'un statif, d'une pince et d'une noix de serrage.

Mode opératoire

■ ***Hydrolyse enzymatique du saccharose***
Dans une fiole erlenmeyer de 250 cm^3, introduire :
– 10 cm^3 de tampon acéto-acétique pH 4,7 ;
– 10 cm^3 de solution de saccharose 0,6 mol/L.
Préchauffer ce milieu quelques minutes à 25 °C. Ajouter alors 5 cm^3 d'une solution d'invertase, également préchauffée à 25 °C. Déclencher en même temps un chronomètre ou bien noter l'heure.
Après 30 minutes d'incubation à 25 °C, arrêter la réaction en ajoutant au contenu de la fiole 5 cm^3 d'acide trichloracétique à 60 g/L (dénaturant protéique).

■ ***Mise en évidence qualitative de la réaction d'hydrolyse du saccharose***
Dans un tube à essais, introduire :
– 2 cm^3 de solution A de liqueur de Fehling (solution cuivrique) ;
– 2 cm^3 de solution B de liqueur de Fehling (solution tartro-sodique) ;
– 2 cm^3 de solution de saccharose 0,6 mol/L.
Porter à ébullition et vérifier l'absence de pouvoir réducteur (une infime quantité de précipité est parfois la conséquence de certaines impuretés, il ne faut pas la prendre en compte).
Opérer de la même façon en remplaçant les 2 cm^3 de solution de saccharose par 2 cm^3 de milieu réactionnel. Observer un important précipité qui est l'indication de l'apparition d'un pouvoir réducteur conséquent.
Conclure et interpréter.

■ ***Calcul du rendement d'hydrolyse du saccharose***
• *Etalonnage de la liqueur de Fehling (fig. 2.4)*
L'étalonnage de la liqueur de Fehling est fait dans un premier temps à l'aide d'une solution étalon de glucose à 5 g/L.
Dans une fiole erlenmeyer de 100 cm^3, verser :
– 10 cm^3 de solution cuivrique (volume mesuré avec précision) ;
– 10 cm^3 de solution tartro-sodique.
Ajouter 2 grains de pierre ponce. Agiter.
Porter à ébullition, puis verser goutte à goutte la solution étalon de glucose (contenue dans la burette), en maintenant l'ébullition.
Observer la décoloration progressive du surnageant (laisser décanter le précipité de Cu_2O).

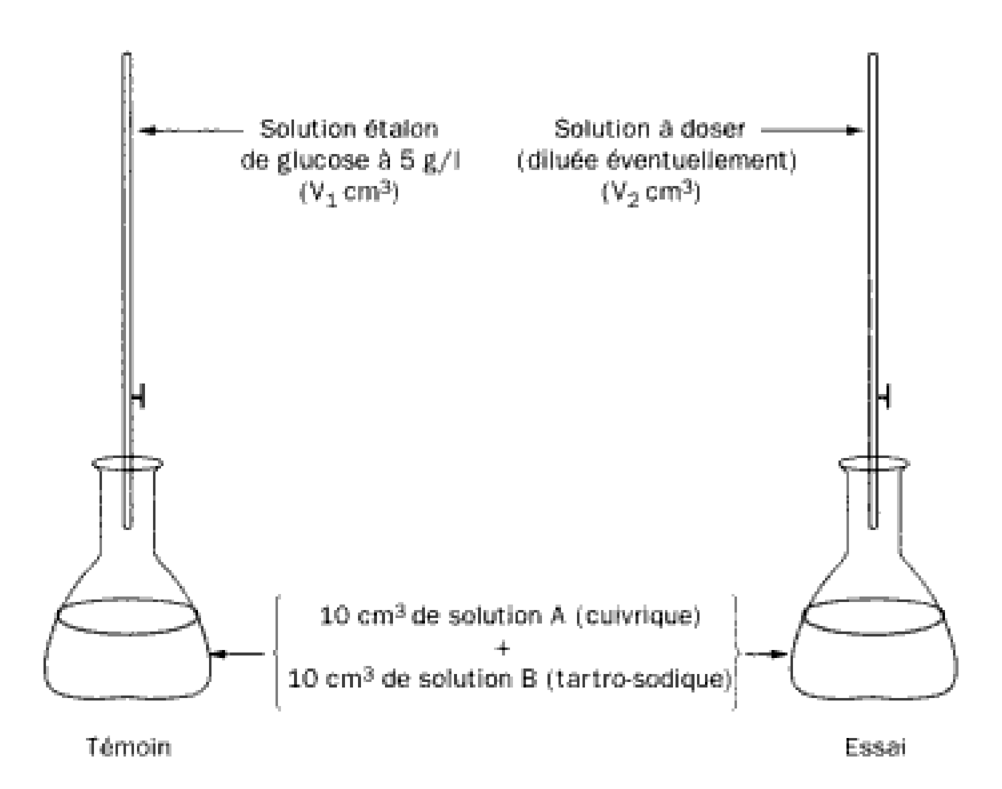


Figure 2.4. Schéma du dosage de Fehling.

Poursuivre jusqu'à la décoloration totale (surnageant incolore) ou léger excès (surnageant légèrement jaune).
Soit V_1 cm^3 la chute de burette.
Procéder à un second étalonnage en opérant avec la solution de fructose à 5 g/L. Constater que glucose et fructose possèdent le même pouvoir réducteur.
• *Essai préliminaire*
La chute de burette de l'essai doit être du même ordre de grandeur que celle de l'étalonnage. Si tel n'était pas le cas, il faut diluer le milieu réactionnel.
Afin de déterminer la dilution à réaliser, on effectue un essai préliminaire en suivant le même mode opératoire que pour l'étalonnage de la liqueur de Fehling et en plaçant le milieu réactionnel dans la burette. On effectue une dilution si cela est nécessaire, le taux de dilution étant calculé en tenant compte de la chute de burette obtenue lors de l'essai préliminaire.
• *Dosage des sucres réducteurs dans le milieu réactionnel*
Faire un essai en emplissant la burette du milieu réactionnel éventuellement dilué et opérer comme pour l'étalonnage.
Soit V_2 la chute de burette. Si V_2 est trop différent de V_1, procéder à un nouvel essai en modifiant la dilution, compte tenu du résultat trouvé au premier essai.

Résultats, observations et interprétation

Calcul de la concentration de sucres réducteurs dans le milieu réactionnel (soit x' la concentration massique en sucres réducteurs de la solution diluée analysée) :

$$x' = \frac{V_1}{V_2} \times 5 \text{ g/L}$$

Soit x la concentration massique en sucres réducteurs dans le milieu réactionnel et d le coefficient de dilution (taux de la dilution éventuelle effectuée après l'essai préliminaire) :

$$x = x' \times d = \frac{V_1}{V_2} \times 5 \times d \text{ g/L}$$

Calcul de la masse de sucres réducteurs apparus dans le milieu réactionnel :

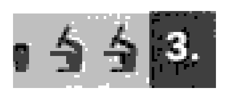
$$m = \frac{V_1}{V_2} \times 5 \times d \times \frac{30}{1\,000} = x' \times d \times \frac{30}{1\,000} \text{ g}$$

La masse de saccharose soumise à hydrolyse est égale à :

$$m' = \frac{342 \times 0{,}6 \times 10}{1\,000} = 2{,}05 \text{ g}$$

Le rendement de l'hydrolyse en 30 minutes est de :

$$\rho = \frac{m}{m'} \times \frac{342}{360} \times 100 \text{ \%.}$$



3. Dosage des sucres réducteurs d'un jus de fruit par la méthode de Bertrand

Mots clés

Jus de fruit, pouvoir réducteur, méthode de Bertrand.

Principe

Cette manipulation très délicate à réaliser permet de doser les sucres réducteurs contenus dans un jus de fruit frais. Les sucres réducteurs contenus dans la prise d'essai d'échantillon à doser réduisent partiellement un volume de liqueur cupro-alcaline. L'oxyde cuivreux formé (Cu_2O) est dosé par manganimétrie. Une table donne la correspondance entre la masse de cuivre précipité sous forme de Cu_2O et la masse de glucose ou la masse de sucres réducteurs exprimée en équivalents-glucose (en mg) contenue dans la prise d'essai.

– Equation de réaction de l'oxydation du glucose en milieu alcalin :

$$(2\,Cu^{2+} + 2\,OH^- + 2\,e^- \rightarrow Cu_2O + H_2O) \times 5$$

$$\text{sucres réducteurs} \rightarrow \text{produits d'oxydation} + n\,e^-$$

– Equation d'oxydation de l'oxyde cuivreux par une solution ferrique acide :

$$(Cu_2O + 2H^+ \rightarrow 2\,Cu^{2+} + H_2O + 2e^-) \times 5$$

$$(Fe^{3+} + e^- \rightarrow Fe^{2+}) \times 10$$

$$5\,Cu_2O + 10\,H^+ + 10\,Fe^{3+} \rightarrow 10\,Cu^{2+} + 5H_2O + 10\,Fe^{2+}$$

– Equation de l'oxydation du Fe^{2+} par le permanganate :

$$(Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + e^-) \times 10$$

$$(MnO_4^- + 8\,H^+ + 5e^- \rightarrow Mn^{2+} + 4\,H_2O) \times 2$$

$$10\,Fe^{2+} + 2\,MnO_4^- + 16\,H^+ \rightarrow 10\,Fe^{3+} + 2Mn^{2+} + 8H_2O$$

Conditions à respecter :

– Eviter tout contact du précipité de Cu_2O avec l'air, de manière à empêcher la réoxydation de l'oxyde cuivreux.
– Le volume de la prise d'essai de l'échantillon à analyser doit être égal à 20 cm^3.
– Le volume total mis en expérience doit être égal à 60 cm^3.
– La prise d'essai doit contenir entre 10 et 90 mg de sucres réducteurs exprimés en équivalent-glucose.
– Chauffer à ébullition douce, **3 minutes exactement**.
– Faire de nombreux lavages du précipité de Cu_2O de manière à éliminer toute trace de tartrate.

Sécurité

La manipulation présente un risque de projection si l'ébullition n'est pas rigoureusement contrôlée, il faut absolument éviter les surchauffes locales. Le port de lunettes de protection est conseillé.

La liqueur de Bertrand, identique à celle de Fehling, ne doit pas être pipetée à la bouche, il faut éviter tout contact avec la peau, les muqueuses et les yeux. Les solutions cuivriques sont placées dans la classe 3 de la classification toxicologique helvétique (poison puissant), l'hydroxyde de sodium dans la classe 2 (poison très puissant).

La solution ferrique acide comporte de l'alun de fer et d'ammonium qui est placé dans la classe 3 de la classification toxicologique helvétique (poison puissant) et de l'acide sulfu-

rique placé dans la classe 1 (poison très puissant et corrosif). Elle ne doit pas être pipetée à la bouche. Il faut éviter tout contact avec la peau, les muqueuses et les yeux.
Le permanganate de potassium est placé dans la classe 3 de cette même classification (poison puissant).
L'acide chlorhydrique est placé dans la classe 2 de la classification toxicologique helvétique (poison très puissant). Eviter tout contact avec la peau, les yeux et les muqueuses (utiliser des lunettes de protection).

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

Effectuer le dosage sur un fruit sucré, à pleine maturité, gorgé de jus : pêche, poire, ananas, melon, etc. Le presser de façon à en exprimer le maximum de jus. Filtrer sur gaze, puis sur papier. Verser 2 cm^3 de ce jus dans une fiole jaugée de 50 cm^3. Ajuster au trait de jauge avec de l'eau distillée. (Le volume de 2 cm^3 pourra être modifié en fonction de la teneur en sucres réducteurs du fruit utilisé, après l'essai préliminaire.)

■ ***Réactifs***

– Réactif cupro-alcalin de Bertrand (Il est identique à la liqueur de Fehling) :
  – solution A cuivrique :
  • $CuSO_4$, 5 H_2O pur p.a. 40 g
  • H_2SO_4 pur 5 cm^3
  • eau distillée qsp 1 000 cm^3
  – solution tartro-sodique :
  • tartrate double de potassium et de sodium 200 g
  • lessive de soude pure (d = 1,33) 375 cm^3
  • eau distillée qsp 1 000 cm^3
– Solution ferrique acide :
  – alun de fer et d'ammonium (ammonium-fer (III) sulfate) dodécahydraté pur p.a. 125 g
  – eau distillée 400 cm^3
  – H_2SO_4 concentré (d = 1,84) 110 cm^3
  – eau distillée qsp 1 000 cm^3
– Acide chlorhydrique de lavage :
  – HCl concentré 330 cm^3
  – eau distillée qsp 1 000 cm^3
– Solution de permanganate de potassium 0,01 mol/L :
  – permanganate de potassium pur p.a. 1,5804 g
  – eau distillée bouillie froide qsp 1 000 cm^3

Etalonner cette solution par une solution de contrôle de sel de Mohr ou d'oxalate de sodium.

■ ***Matériel***

– Une fiole erlenmeyer de 150 cm^3 à col étroit.
– Une éprouvette de 20 cm^3.
– Un filtre d'Allihn (verre fritté de porosité n° 4).
– Une fiole à vide.
– Une burette de 25 cm^3 au 1/10 de cm^3.
– Une pipette jaugée de 20 cm^3.
– Une poire d'aspiration.

Mode opératoire

■ ***Essai préliminaire***

Dans un tube à essais, verser (mesures à l'éprouvette) :
– 2 cm^3 de solution cuivrique (A) ;
– 2 cm^3 de solution tartro-sodique (B) ;
– 2 cm^3 de solution diluée de jus de fruit.

Le mélange prend une coloration bleue intense. Faire bouillir pendant 3 minutes. Laisser reposer le précipité. Observer la coloration du surnageant. Un précipité rouge et un surnageant bleu indiquent que le dosage est possible. Un surnageant incolore ou jaune indique une solution à doser trop concentrée. Dans ce cas, diluer la solution et recommencer l'essai préliminaire. (A titre d'exemple, on peut signaler que, si l'on opère sur du jus d'ananas frais, il est nécessaire de diluer le jus au 1/25.)

■ ***Dosage***

• *Précipitation et lavage de l'oxyde cuivreux*

Dans une fiole erlenmeyer de 150 cm^3, à col étroit, propre (lavée avec HCl dilué chaud et rincée 3 fois avec de l'eau distillée), verser (mesures à l'éprouvette) :
– 20 cm^3 de solution cuivrique (A) ;
– 20 cm^3 de solution tartro-sodique (B) ;
– 20 cm^3 de solution à doser.

Ou bien opérer de la manière suivante : dans la fiole erlenmeyer, verser (mesures à l'éprouvette) :
– 20 cm^3 de solution cuivrique (A) ;
– 20 cm^3 de solution tartro-sodique (B) ;
– x cm^3 de solution à doser (à la pipette, x étant calculé grâce à l'essai préliminaire) ;
– $(20 - x)$ cm^3 d'eau distillée.

Porter à ébullition douce, 3 minutes exactement. Laisser refroidir la fiole inclinée.

Préparer un filtre d'Allihn, le laver avec HCl de lavage, puis à l'eau distillée, l'adapter sur la fiole à vide.

Décanter la quasi-totalité du surnageant sur le filtre à l'aide d'un agitateur.

Ne pas entraîner de précipité.

Laisser le précipité sous une couche de liquide, la fiole étant inclinée.

Le précipité ne doit jamais être en contact avec l'air.

Faire une légère aspiration avec la trompe à vide, puis couper l'aspiration en débranchant la trompe quand il reste 1 cm de hauteur de liquide dans le filtre.

Dans la fiole erlenmeyer, introduire environ 20 cm^3 d'eau distillée bouillante. Agiter, laisser reposer, fiole inclinée. Décanter le surnageant sur le filtre comme précédemment.

Recommencer plusieurs fois ce lavage (au moins 6 fois) afin d'éliminer toute trace de tartrate.

• *Oxydation de Cu_2O*

Vider la fiole à vide, bien la rincer, remettre le filtre en place.

Dans la fiole erlenmeyer où se trouve le précipité de Cu_2O, sous une couche d'eau, ajouter 20 cm^3 de solution ferrique acide. Cu_2O se dissout.

Agiter jusqu'à dissolution totale, la solution prend une teinte verte.

Verser cette solution sur le filtre. Elle entraîne le précipité qui se trouve sur le filtre.

Provoquer un passage lent de cette solution par une action modérée du vide.

Ajouter encore deux fois dans la fiole erlenmeyer 10 cm^3 environ de solution ferrique acide en rinçant bien les parois. Faire passer sur le filtre.

Laver la fiole 3 fois avec un peu d'eau distillée bouillante. Faire passer sur le filtre.

• *Dosage du sel ferreux formé par une solution de permanganate*
Refroidir totalement le contenu de la fiole à vide.
Titrer, dans la fiole à vide, les ions ferreux par une solution de permanganate de titre C mol/L, jusqu'à obtenir une coloration rose stable quelques secondes (10 à 20 s).
La succession de teintes au virage est : vert, gris sale, puis légère teinte rose homogène.
Si le virage est impossible à voir, cela indique des lavages insuffisants du précipité.

Résultats, observations et interprétation

Soit V la chute de burette en cm^3 et C le titre en molarité du permanganate. La masse de cuivre m_{Cu}, exprimée en mg, précipité sous forme de Cu_2O est égale à :

$$m_{Cu} = 63{,}54 \times C \times V \text{ mg}$$

On détermine, à l'aide de la table de correspondance de Bertrand *(tab. 2.II)*, la masse de glucose ou de sucres réducteurs, exprimée en mg de glucose ($m_{glucose}$), contenue dans la prise d'essai (en faisant le cas échéant une interpolation linéaire).

– Si le dosage a été effectué sur 20 cm^3 de jus de fruit dilué 25 fois, la teneur en sucres réducteurs exprimée en glucose est égale à :

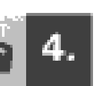
$$\text{Concentration en sucres réducteurs exprimée en glucose} = m_{glucose} \times \frac{25}{20} \text{ g/L}$$

– Si le dosage a été effectué sur X cm^3 de solution à doser :

$$\text{Concentration en sucres réducteurs exprimée en glucose} = m_{glucose} \times \frac{25}{X} \text{ g/L}$$

Tableau 2.II Tableau de correspondance entre les masses de cuivre et de glucose. Méthode de Bertrand

Glucose en mg	Cuivre en mg	Glucose en mg	Cuivre en mg	Glucose en mg	Cuivre en mg
10	20,4	40	77,5	70	129,8
11	22,4	41	79,3	71	131,4
12	24,3	42	81,1	72	133,1
13	26,3	43	82,9	73	134,7
14	28,3	44	84,7	74	136,3
15	30,2	45	86,4	75	137,9
16	32,2	46	88,2	76	139,6
17	34,2	47	90,0	77	141,2
18	36,2	48	91,8	78	142,8
19	38,1	49	93,6	79	144,5
20	40,1	50	95,4	80	146,1
21	42,0	51	97,1	81	147,7
22	43,9	52	98,9	82	149,3
23	45,8	53	100,6	83	150,9
24	47,7	54	102,3	84	152,5
25	49,6	55	104,1	85	154,0
26	51,5	56	105,8	86	155,6
27	53,4	57	107,6	87	157,2
28	55,3	58	109,3	88	158,8
29	57,2	59	111,1	89	160,4
30	59,1	60	112,8	90	162,0
31	60,9	61	114,5	91	163,6
32	62,8	62	116,2	92	165,2
33	64,6	63	117,9	93	166,7
34	66,5	64	119,6	94	168,3
35	68,3	65	121,3	95	169,9
36	70,1	66	123,0	96	171,5
37	72,0	67	124,7	97	173,1
38	73,8	68	126,4	98	174,6
39	75,7	69	128,1	99	176,2
				100	177,8



4. Séparation des sucres d'un jus de fruit par chromatographie sur couche mince

Mots clés

Chromatographie, couche mince, gel de silice, jus de fruit.

Principe

Les sucres du jus de fruit sont séparés par une chromatographie d'adsorption. La phase stationnaire est constituée de gel de silice, la phase mobile est un mélange monophasique de trois solvants de polarités différentes : méthyl-éthyl-cétone (butanone), acide acétique et méthanol.

Les spots sont révélés par la réaction de Molisch. L'identification de certains sucres de l'échantillon est rendue possible grâce à des témoins. Chaque sucre est caractérisé par son Rf, rapport de la distance de migration du spot à la distance de migration du front du solvant.

Sécurité

Cette manipulation ne présente pas de danger majeur sur le plan toxicologique. Le méthyl-éthyl-cétone et le méthanol sont placés dans la classe 5 de la classification toxicologique helvétique, l'acide acétique est placé dans la classe 3.

En revanche la pulvérisation du révélateur contenant du naphtol-1 et de l'acide sulfurique doit se faire sous une hotte ventilée car, fortement caustique, ce réactif irrite fortement les voies respiratoires.

Le caractère fortement inflammable du mélange de solvants nécessite une manipulation effectuée en l'absence de toute flamme.

Matière d'œuvre

■ ***Matière biologique***

Effectuer l'expérience sur un fruit sucré, à pleine maturité, gorgé de jus : pêche, poire, ananas, melon, etc. Le presser de façon à en exprimer le maximum de jus. Filtrer sur gaze, puis sur papier.

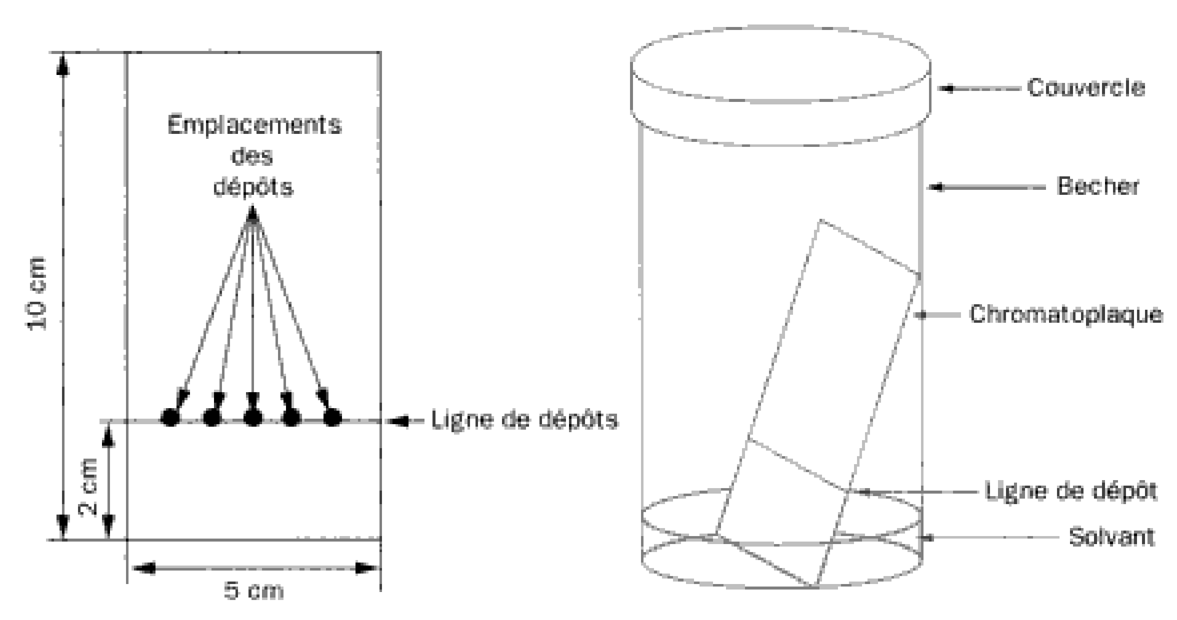


Figure 2.5. Schéma de la chromatoplaque et de la cuve de chromatographie.

■ ***Réactifs***

– Solution témoin de glucose à 5 g/L, dans l'eau.
– Solution témoin de fructose à 5 g/L, dans l'eau.
– Solution témoin de xylose à 5 g/L, dans l'eau.
– Solution témoin de saccharose à 5 g/L, dans l'eau.
– Solvant : dans une ampoule à décanter, verser :
  – méthyl-éthyl-cétone 3 volumes
  – acide acétique 1 volume
  – méthanol 1 volume

  Agiter, laisser reposer.
– Révélateur, réactif de Molisch :
  – naphtol-1 0,25 g
  – éthanol 50 cm^3
  – H_2SO_4 à 20 % 50 cm^3

■ ***Matériel*** *(fig. 2.5)*

– Chromatoplaque 10 cm × 5 cm de gel de silice sur verre (réf. Merck 1.105789.0001).
– Becher de 250 cm^3, recouvert d'une demi-boîte de Pétri. (Le becher doit avoir un diamètre d'environ 7 à 8 cm et une hauteur de 12 cm environ.)
– Pipettes capillaires de verre obtenues par étirage de cannes de verre.
– Thermoventilateur (sèche-cheveux).
– Une étuve réglable à 100 °C.
– Un pulvérisateur pour révélateur de chromatographie.

Mode opératoire

■ ***Préparation de la chromatoplaque***

Réactiver la plaque en la plaçant 15 minutes à l'étuve, à 100 °C.
Tracer au crayon graphite, très légèrement, une ligne de dépôt à 2 cm du bord inférieur de la plaque.
Marquer, très légèrement, les emplacements de 5 dépôts espacés de 0,8 cm.

■ ***Préparation de la cuve***

Verser au fond de la cuve le solvant, sur une hauteur de 1 cm. Il est important de vérifier que le niveau du solvant est inférieur à la hauteur de la ligne de dépôt de la plaque (2 cm).
Attendre 30 minutes que la cuve soit saturée en vapeurs de solvant.

■ ***Dépôts***

Utiliser des capillaires préparés par étirage de cannes de verre de 5 à 6 mm de diamètre.
Ne conserver que les capillaires réguliers, de section constante et de diamètre convenable (les tester sur papier filtre juste avant le dépôt).
Un capillaire n'est utilisé que pour déposer une seule solution.
Le dépôt ne doit pas excéder un diamètre de 2 à 3 mm (à cause de l'étalement de la tache au cours de la migration).
Effectuer les dépôts en trois fois, en séchant au thermoventilateur entre chaque opération.
Déposer les solutions témoins de glucose, fructose, saccharose et xylose, ainsi que le jus de fruit.

■ ***Migration***

Mettre en place la plaque dans la cuve, en appui oblique. Replacer le couvercle immédiatement. Laisser la migration se poursuivre jusqu'au moment où le front du solvant atteint le bord supérieur de la plaque.

Sortir le chromatogramme, le placer horizontalement, marquer le front du solvant.
Sécher à l'air chaud.

■ ***Révélation***
Pulvériser le révélateur, sous hotte ventilée. Chauffer 15 minutes à 100 °C, à l'étuve.

Résultats, observations et interprétation

Entourer les spots d'un trait de crayon au sortir de l'étuve. Dénombrer le nombre de spots correspondant au jus de fruit.
Calculer les Rf.
Identifier la présence éventuelle des témoins dans l'échantillon.

5. Analyse polarimétrique des glucides

Mots clés

Pouvoir rotatoire, polarimétrie, polarimètre de Laurent.

Principe

Dans la structure des glucides, il existe au moins un centre de chiralité, sauf pour la dihydroxyacétone. Les solutions d'ose ou d'oside présentent donc le phénomène de polarisation rotatoire.
Une solution d'ose ou d'oside traversée par un faisceau de lumière polarisée fait tourner d'un angle α le plan de polarisation de la lumière. L'angle α est donné par la loi de Biot :

$$\alpha = [\alpha] \times l \times c$$

- α = pouvoir rotatoire de la solution, c'est-à-dire angle de rotation du plan de polarisation (en degrés d'angle)*.
- $[\alpha]$ = pouvoir rotatoire spécifique de la substance dissoute (en degrés d'angle)*.
- l = longueur de solution traversée (en dm)*.
- c = concentration massique de la solution en g/cm^3*.

* La loi de Biot est ici exprimée avec ses unités usuelles et non avec les unités du système international.

$[\alpha]$ est positif si la substance est dextrogyre, $[\alpha]$ est négatif si la substance est lévogyre.
Le pouvoir rotatoire spécifique est caractéristique d'une substance et dépend de :
– la longueur d'onde de la lumière polarisée ;
– la température ;
– la nature du solvant.
Conventionnellement, le pouvoir rotatoire spécifique est exprimé pour la longueur d'onde de la raie D du sodium (589-596 nm), à 20 °C.
Exemples : glucose en solution : $[\alpha]_D$ à 20 °C = + 52,5° ; saccharose : $[\alpha]_D$ à 20 °C = + 66,5°.
La loi de Biot est une loi additive : si plusieurs substances optiquement actives, sans action chimique les unes sur les autres, sont présentes dans une solution, la rotation résultante est égale à la somme algébrique des rotations dues à chacun des composants du mélange.

Utilisation du polarimètre de Laurent

Mettre en place l'appareil, la lampe à vapeur de sodium, l'éclairage du vernier. Déterminer la graduation et la précision du vernier.
Mettre en place dans l'appareil un tube rempli d'eau distillée. A l'aide de l'oculaire, mettre au point sur le bord de la lame demi-onde. Se placer dans les conditions optimales d'éclairement en réglant l'angle de pénombre. Réaliser l'égalité d'éclairement des plages. Mettre la graduation du vernier à zéro, détruire et rétablir des plages, on doit retrouver le réglage du zéro.
Remplir le tube avec la solution à analyser qui doit être limpide et incolore. Rétablir l'identité d'éclairement des plages. Lire α (signe et valeur).
Faire une dizaine de déterminations en retournant le tube de bout en bout. Calculer la valeur moyenne de α.
Rincer soigneusement le tube et essuyer la gouttière.

5.1. Mutarotation du glucose

Mots clés

Mutarotation, polarimétrie, α-D-glucopyranose.

Principe

Le glucose naturel en solution est un mélange de la forme aldéhydique (qui existe à l'état de traces) et des deux formes cycliques α et β glucopyranosiques qui prédominent largement.
A l'état cristallisé, le D-glucose industriel existe sous forme α. Mis en solution, l'α-D-glucopyranose se tautomérise en β-D-glucopyranose, il s'établit progressivement un équilibre entre les trois formes présentées à la *figure 2.6*.

β-D-glucopyranose ⇌ D-glucose aldéhydique ⇌ α-D-glucopyranose

Figure 2.6. Tautomérie du glucose en solution.

Dans l'eau distillée, à température ambiante, cet équilibre est atteint au bout de plusieurs heures.
La mutarotation est la variation de pouvoir rotatoire accompagnant la conversion α ⇔ β, jusqu'à la valeur d'équilibre.
Partant du glucose industriel, l'α-D-glucopyranose ($[\alpha]_D$ = + 113°), la solution initiale a un pouvoir rotatoire élevé qui décroît dans le temps, au fur et à mesure de la transformation α → β. Lorsque, après quelques heures, l'équilibre est atteint, le pouvoir rotatoire spécifique se stabilise à la valeur de + 52,5°, qui correspond à un mélange de 65 % d'anomère β, 35 % d'anomère α, plus une faible quantité de forme linéaire aldéhydique (0,1 % environ) *(fig. 2.7)*.

Sécurité

Cette manipulation ne présente aucun danger.

Matière d'œuvre

■ ***Matière biologique***
α-D-glucopyranose.

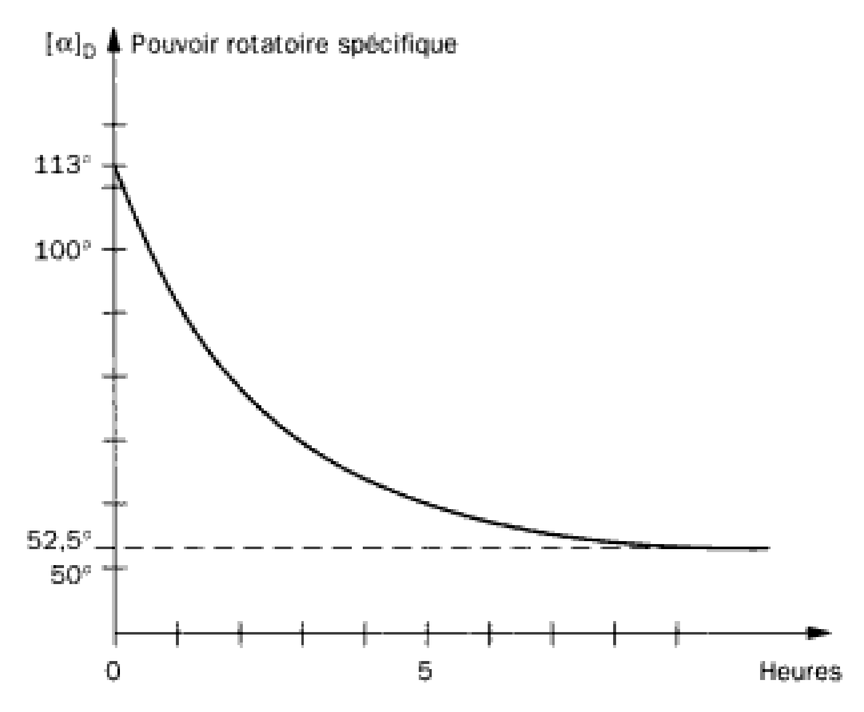


Figure 2.7. Mutarotation de l'α-D-glucopyranose.

■ ***Matériel***
– Un polarimètre de Laurent.
– Une fiole jaugée de 100 cm^3.
– Une balance de précision.
– Un chronomètre.

Mode opératoire

Faire les réglages du polarimètre avec de l'eau.
Préparer 100 cm^3 d'une solution d'α-D-glucopyranose pur par pesée exacte de cristaux, de concentration 100 g/L. Déclencher le chronomètre au moment de la mise en solution. Transvaser rapidement dans le tube polarimétrique.
Mesurer α toutes les 2 à 5 minutes pendant 30 minutes, puis toutes les 10 minutes, enfin toutes les 15 minutes, jusqu'à obtention d'un pouvoir rotatoire constant.

Résultats, observations et interprétation

Calculer [α] pour chaque mesure et tracer la courbe [α] = f (t).
Extrapoler au temps zéro pour trouver [α] de l'α-D-glucopyranose.

5.2. Etude de l'hydrolyse (inversion) du saccharose par polarimétrie

Mots clés

Saccharose, hydrolyse, polarimétrie.

Principe

L'hydrolyse enzymatique du saccharose est catalysée par une enzyme appelée saccharase ou invertase (voir I.2.2).

La mise en évidence de la réaction d'inversion est fondée sur l'apparition de deux hexoses n'ayant pas le même pouvoir rotatoire. Le saccharose, dioside, est hydrolysé en D-fructofuranose et en D-glucopyranose (voir I.2.5.1).

Saccharose, $[\alpha] = + 66{,}5°$
D-fructose, $[\alpha] = - 93°$
D-glucose, $[\alpha] = + 52{,}5°$

Sécurité

L'acide trichloracétique est un produit dangereux et très corrosif. Il est placé dans la classe 2 de la classification toxicologique helvétique. Le port des lunettes de protection est fortement conseillé.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

- Solution d'invertase : solution d'enzyme (enzyme Merck à 200 U/mg) à 0,5 mg/cm^3 dans un tampon phosphate 0,025 mol/L, pH 7. (A conserver au froid [+ 4 °C].)
- Solution de saccharose à 0,6 mol/L.

■ ***Réactifs***

- Tampon pH 4,7 :
  - acétate de sodium : 8,2 g/L,
  - acide acétique pur pour analyses : 5,8 cm^3/L.
- Acide trichloracétique à 60 g/L.

■ ***Matériel***

- Une fiole erlenmeyer de 250 cm^3.
- Deux pipettes jaugées de 10 cm^3.
- Une pipette jaugée de 5 cm^3.
- Une poire d'aspiration.
- Une éprouvette de 10 cm^3.
- Un bain thermostaté réglable à 25 °C, équipé d'un statif, d'une pince et d'une noix de serrage.

Mode opératoire

■ ***Hydrolyse enzymatique du saccharose***

Dans une fiole erlenmeyer de 250 cm^3, introduire :
- 10 cm^3 de tampon acéto-acétique pH 4,7 ;
- 10 cm^3 de solution de saccharose 0,6 mol/L.

Préchauffer ce milieu quelques minutes à 25 °C. Ajouter alors 5 cm^3 d'une solution d'invertase, également préchauffée à 25 °C. Déclencher en même temps un chronomètre ou bien noter l'heure.
Après 30 minutes d'incubation à 25 °C, arrêter la réaction en ajoutant au contenu de la fiole 5 cm^3 d'acide trichloracétique à 60 g/L (dénaturant protéique).

■ ***Mesure de la concentration en substrat***

Mélanger :
- 10 cm^3 de solution de saccharose 0,6 mol/L ;
- 10 cm^3 de tampon acétate pH 4,7 ;
- 10 cm^3 d'eau distillée.

Remplir le tube polarimétrique de ce mélange.

Mesurer son pouvoir rotatoire au polarimètre, soit α_0 cette mesure.
Calculer la concentration initiale de saccharose, avant hydrolyse (C_0), en appliquant la loi de Biot.

$$c_0 = \frac{\alpha_0}{(66,5 \times l)}$$

■ *Mesure du pouvoir rotatoire des produits de l'hydrolyse du saccharose*
Remplir le tube polarimétrique du milieu réactionnel, après les 30 minutes de réaction.
Mesurer son pouvoir rotatoire, α_{30}.

Résultats, observations et interprétation

■ *Calcul du rendement de la réaction d'hydrolyse du saccharose*
Soit C_S la concentration en saccharose résiduel non hydrolysé (cette concentration peut être nulle), C la concentration en D-glucose apparu qui est égale à la concentration en D-fructose apparu.

On a : $$\alpha_{30} = 66,5\ C_S + 52,5\ C - 93\ C \qquad (1)$$

On a également : $$C = (C_0 - C_S) \times \frac{180}{342}$$

en remplaçant dans l'équation (1), on a :

$$\alpha_{30} = 66,5\ C_S + (C_0 - C_S) \times \frac{180}{342} \times (52,5 - 93) \qquad (2)$$

L'équation (2) permet de calculer C_S, le rendement ρ s'écrit alors :

$$\rho = \frac{C_0 - C_S}{C_0} \times 100 \text{ (en \%)}$$

6. Etude de quelques propriétés de l'amidon

Mots clés

Amidon, réserve glucidique végétale.

Principe

L'amidon est la principale réserve glucidique des végétaux. Insoluble dans l'eau froide, il forme un gel lorsqu'une suspension de cette macromolécule est chauffée vers 70 °C, c'est l'empois d'amidon.

L'amidon naturel est un mélange d'amylose et d'amylopectine.

L'amylose est formée de chaînes de 200 à 300 résidus d'α-D-glucopyranose associées par des liaisons osidiques α-1→4. La chaîne d'amylose possède une structure hélicoïdale.

L'amylopectine présente une structure ramifiée comportant environ 1 000 résidus de glucose groupés en chaînes de 20 à 25 résidus d'α-D-glucopyranose reliés par des liaisons 1→4. Les chaînes sont unies les unes aux autres par des liaisons 1→6. Les masses moléculaires varient, selon les origines, de 50 000 à quelques centaines de mille daltons *(fig. 2.8)*.

Structure de l'amylose

Structure de l'amylopectine

Figure 2.8. Structure de l'amylose et de l'amylopectine.

L'hydrolyse chimique à chaud et en milieu acide aboutit au glucose.

L'hydrolyse enzymatique est catalysée par quatre sortes d'enzymes :

- Les *α-amylases* qui scindent les liaisons 1→4 à l'intérieur des chaînes non ramifiées. Ces enzymes rencontrées chez certains micro-organismes, les végétaux et les animaux (amylases salivaire et pancréatique), liquéfient rapidement les empois d'amidon à la suite de la formation de dextrines et, finalement, de la libération de maltose et d'isomaltose, les liaisons 1→6 de l'amylopectine n'étant pas rompues.

– Les *β-amylases* qui décrochent directement des unités maltose à partir des extrémités non réductrices. Ces enzymes sont abondantes dans les graines amylacées en germination (orge germé).
– Les *(1-6)-glucosidases,* encore appelées enzymes débranchantes qui provoquent l'hydrolyse des liaisons 1→6.
– Les *maltases* qui scindent la molécule de maltose en deux molécules de glucose.

6.1. Préparation d'amidon à partir de pomme de terre

Mots clés

Amidon, pomme de terre.

Sécurité

Cette manipulation ne présente aucun danger.

Matériel et matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***
Une pomme de terre.

■ ***Réactifs***
Du lugol :

– iode	4 g
– iodure de potassium	8 g
– eau distillée qsp	1 000 cm^3

■ ***Matériel***
– Une râpe à légumes.
– Un linge de coton.
– Un microscope.
– Un erlenmeyer de 100 cm^3.
– Une pince en bois.
– Un bec Bunsen.

Mode opératoire

Râper une pomme de terre et introduire la pulpe obtenue dans 200 à 300 cm^3 d'eau froide. Agiter fortement et comprimer cette masse à l'aide d'un linge de coton. Laisser décanter le filtrat. Une poudre blanchâtre se dépose : elle est constituée essentiellement de grains d'amidon (fécule).
Observer ces grains d'amidon au microscope avec et sans lugol *(fig. 2.11A)*.

Résultats, observations et interprétation

Les grains d'amidon ont un aspect spécifique de l'origine végétale. Ils sont formés d'un hile punctiforme autour duquel s'organisent des zones concentriques alternativement foncées et claires.
En présence d'iode les grains d'amidon se colorent fortement en bleu.
Dans une fiole erlenmeyer de 250 cm^3, introduire environ 100 cm^3 d'eau distillée, et l'équivalent d'une petite cuillère de poudre d'amidon humide. Agiter fortement. On obtient

une suspension laiteuse appelée lait d'amidon, ce qui prouve que l'amidon est insoluble dans l'eau froide.
Chauffer doucement cette suspension, le liquide devient opalescent. On a obtenu une solution colloïdale, l'empois d'amidon. Les grains hydratés ont éclaté sous l'effet de la chaleur, libérant les chaînes macromoléculaires d'amidon qui forment un gel.

6.2. Mise en évidence de la structure macromoléculaire de l'amidon par une expérience de dialyse

Mots clés

Amidon, dialyse, structure macromoléculaire.

Principe

La dialyse est une technique qui permet de séparer des substances présentant des capacités différentes à franchir les pores d'une membrane ; elle rend possible la séparation des grosses et petites molécules.

Sécurité

La réaction à la liqueur de Fehling doit être pratiquée avec soin et précaution, se reporter aux consignes de sécurité décrites p. 26 (voir I.2.1).

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

Empois d'amidon à environ 7 g/L.

■ ***Réactifs***

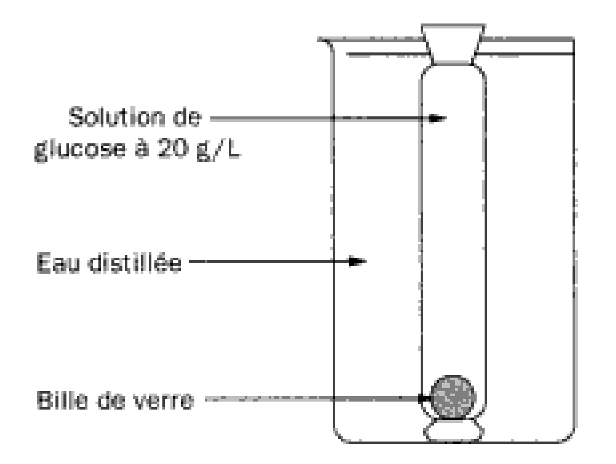
- Solution de glucose à 20 g/L.
- Lugol (composition p. 26) (voir I.2.1).
- Liqueur de Fehling : (composition p. 26) (voir I.2.1) :
  - solution A (cuivrique),
  - solution B (tartro-sodique).

■ ***Matériel***

- Deux bechers de 400 cm^3.
- Deux boudins de dialyse de 1,5 cm de diamètre.
- Deux billes de verre.
- Une pipette compte-gouttes.
- Un tube à essais.
- Une pince en bois.
- Un bec Bunsen.
- Une éprouvette de 10 cm^3.

Mode opératoire

Préparer les deux boudins de dialyse, lestés à l'une de leur extrémité avec une bille de verre.
Y introduire respectivement une solution de glucose à 20 g/L et un empois d'amidon à environ 7 g/L. Ne pas remplir complètement les boudins, les nouer et introduire chacun d'eux dans un becher contenant de l'eau distillée *(fig. 2.9)*.



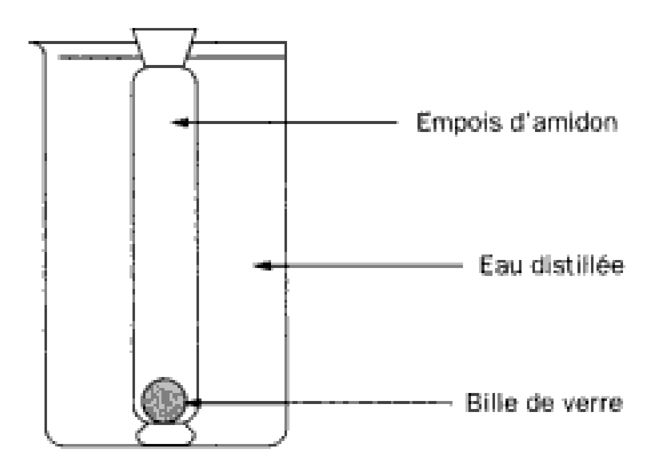


Figure 2.9. Expérience de dialyse.

Après 15 à 30 minutes, prélever 2 cm^3 de chacun des dialysats (contenus du becher).
A la prise d'essai de dialysat correspondant à l'empois d'amidon, ajouter quelques gouttes de lugol, constater l'absence de coloration.
Aux 2 cm^3 de prise d'essai de dialysat correspondant au glucose, ajouter 2 cm^3 de solution A de liqueur de Fehling et 2 cm^3 de solution B. Porter à ébullition, constater l'apparition d'un précipité rouge indiquant la présence d'un pouvoir réducteur.

Résultats, observations et interprétation

Le glucose (masse molaire = 180 g/mol) a dialysé, mais pas l'amidon. On peut ainsi en déduire que la masse moléculaire de l'amidon est élevée, c'est une macromolécule.

6.3. Simplification moléculaire de l'amidon par hydrolyse acide

Mots clés

Amidon, hydrolyse chimique.

Principe

L'hydrolyse est une réaction chimique qui se fait à chaud et en milieu acide. La chaîne polyosidique est coupée (les coupures se font au hasard) en fragments dont la taille diminue au fur et à mesure de la rupture des liaisons pour aboutir au maltose et enfin au glucose. Les composés intermédiaires, appelés dextrines, se colorent différemment en présence d'iode. A partir d'une coloration bleue (amidon), on observe successivement une coloration rouge violacée (coloration due à de gros fragments appelés amylodextrines), rouge (coloration due à des fragments de taille moyenne appelés érythrodextrines), puis l'absence de coloration (due à de petits fragments appelés achrodextrines, ainsi qu'au maltose et au glucose).
L'amidon ne possède pas de pouvoir réducteur, l'hydrolyse s'accompagne de l'apparition et de l'augmentation d'un pouvoir réducteur avec l'accroissement des ruptures de liaisons osidiques.
Le terme de l'hydrolyse acide peut se résumer par l'équation suivante :

$$(C_6H_{10}O_5)n + n\ H_2O \rightarrow n\ C_6H_{12}O_6$$

Sécurité

L'hydrolyse chimique de l'amidon en présence d'acide chlorhydrique présente un certain danger. L'acide chlorhydrique, placé dans la classe 2 de la classification toxicologique helvétique (poison très puissant), est corrosif et irritant. A manipuler avec des lunettes de protection, éviter tout contact avec la peau, les muqueuses et les yeux.
Les précautions à prendre pour l'utilisation de la liqueur de Fehling ont été décrites p. 26.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***
Empois d'amidon à environ 7 g/L.

■ ***Réactifs***
- Acide chlorhydrique 5 mol/L.
- Lugol (composition donnée p. 26) (voir I.2.1).
- Liqueur de Fehling (composition donnée p. 26) (voir I.2.1) :
  - solution A, cuivrique,
  - solution B, tartro-sodique.

■ ***Matériel***
- Une fiole erlenmeyer de 150 cm^3.
- Une éprouvette de 100 cm^3.
- Une pipette graduée de 5 cm^3.
- Une poire d'aspiration.
- Cinq tubes à essais.
- Un portoir métallique de tubes à essais.
- Un bain-marie bouillant.
- Une pipette graduée de 2 cm^3, munie d'une poire d'aspiration.
- Une pipette compte-gouttes.
- Une éprouvette de 10 cm^3.
- Un chronomètre ou une montre à trotteuse.

Mode opératoire

Mélanger 20 cm^3 d'empois d'amidon à 7 g/L et 5 cm^3 d'acide chlorhydrique 5 mol/L. Homogénéiser et introduire 4 cm^3 de ce mélange dans cinq tubes à essais. Plonger ces tubes dans un bain-marie bouillant en notant le temps.
Retirer un tube du bain-marie après 1 minute, un deuxième après 5 minutes, un troisième après 8 minutes, un quatrième après 12 minutes et le dernier après 20 minutes. Refroidir ces tubes au sortir du bain-marie.
Prélever 2 cm^3 de chaque tube ; y ajouter deux volumes d'eau distillée et quelques gouttes de lugol. Noter la coloration obtenue.
Au volume restant dans chaque tube, ajouter 2 cm^3 de solution A de liqueur de Fehling et 2 cm^3 de solution B de liqueur de Fehling. Porter à ébullition.

Résultats, observations et interprétation

Observer la coloration avec l'iode qui, au fur et à mesure que la durée d'hydrolyse augmente, passe du bleu au violet, puis au rouge et finit par disparaître. En revanche le pouvoir réducteur apparaît dès le troisième tube.
Les chaînes d'amidon sont coupées en dextrines, puis en maltose, enfin en glucose.

6.4. Digestion *in vitro* de l'amidon par un extrait pancréatique

Mots clés

Amidon, hydrolyse enzymatique, amylase, pancréatine.

Principe

L'expérience précédente montre que l'hydrolyse chimique de l'amidon se fait dans des conditions de température et de pH incompatibles avec la vie.
L'expérience mise en œuvre dans ce paragraphe a pour but de montrer le rôle catalytique de l'amylase, enzyme contenue dans un extrait pancréatique, appelé pancréatine.

Sécurité

La manipulation ne présente pas de difficultés majeures sur le plan de la sécurité. Les précautions à prendre pour l'utilisation de la liqueur de Fehling ont été décrites (voir I.2.1).
L'utilisation du révélateur de Molisch en chromatographie, irritant et corrosif, doit être pratiquée sous hotte ventilée.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

- Solution tamponnée de substrat : le substrat utilisé est de « l'amidon soluble » préparé par traitement mécanique ou chimique de l'amidon naturel. Dissoudre 1 g d'amidon soluble dans environ 500 cm^3 de solution tampon phosphate pH 7,1-0,020 mol/L. Ajouter 1 g de NaCl. Tiédir si nécessaire. Ajuster à 1 litre avec la solution tampon.
- Solution tamponnée de pancréatine : dissoudre 0,50 g de pancréatine 75 U/mg Merck dans 1 litre de tampon phosphate pH 7,1. (Conservation au froid à + 4 °C, pendant quelques heures.)

Remarque : la teneur en amylase dans la pancréatine peut varier ; il est indispensable d'en vérifier le taux. Pour cela, réaliser l'hydrolyse enzymatique de l'amidon conformément au mode opératoire décrit ci-après, on doit obtenir une décoloration totale en 10 minutes. Sinon modifier la concentration de la solution d'enzyme en conséquence.

■ ***Réactifs***

- Solution tampon phosphate pH 7,1. Dans une fiole jaugée de 1 L, verser :
  - 50 cm^3 de solution KH_2PO_4 à 3,6 g/L,
  - 900 cm^3 d'eau distillée.

  Ajuster à pH 7,1 à l'aide d'une solution de soude 1 mol/L, compléter à 1 L avec de l'eau distillée.
  Vérifier le pH, ajuster à nouveau si nécessaire.
- Solution de lugol (composition décrite p. 26) (voir I.2.1).
- Solution d'acide chlorhydrique 1 mol/L.
- Solution d'hydroxyde de sodium 1 mol/L.
- Liqueur de Fehling (composition décrite p. 26) (voir I.2.1) :
  - solution A (cuivrique),
  - solution B (tartro-sodique).
- Solution témoin de glucose à 5 g/L, dans l'eau.
- Solution témoin de maltose à 5 g/L, dans l'eau.

– Solvant de chromatographie. Dans une ampoule à décanter, verser :
  – méthyl-éthyl-cétone 3 volumes
  – acide acétique 1 volume
  – méthanol 1 volume
  Agiter, laisser reposer.
– Révélateur, réactif de Molisch :
  – naphtol-1 0,25 g
  – éthanol 50 cm^3
  – H_2SO_4 à 20 % 50 cm^3

■ ***Matériel***

– Chromatoplaque 10 cm × 5 cm de gel de silice sur verre (réf. Merck 1.105789.0001).
– Becher de 250 ml, recouvert d'une demi-boîte de Pétri. (Le becher doit avoir un diamètre d'environ 7 à 8 cm et une hauteur de 12 cm environ.)
– Pipettes capillaires de verre obtenues par étirage de cannes de verre.
– Thermoventilateur (sèche-cheveux).
– Une étuve réglable à 100 °C.
– Un pulvérisateur pour révélateur de chromatographie.
– Un bain thermostaté réglable à 37 °C (à défaut, un cristallisoir de 5 litres).
– Un portoir métallique de tubes à essais.
– Quatorze tubes à essais.
– Une pipette jaugée de 5 cm^3.
– Une pipette compte-gouttes.
– Une fiole erlenmeyer de 250 cm^3.
– Une pipette de 2 cm^3.
– Une poire d'aspiration.
– Une éprouvette de 10 cm^3.

Mode opératoire

Préparer un bain d'eau à 37 °C, en utilisant un bain thermostaté ou un cristallisoir de grande capacité.

Préparer 12 tubes à essais contenant chacun 5 gouttes de lugol. Ces tubes sont disposés dans un portoir placé à proximité du bain thermostaté.

Dans une fiole erlenmeyer de 250 cm^3, introduire 100 cm^3 de solution tamponnée d'amidon ; préchauffer à 37 °C cette solution pendant quelques minutes *(fig. 2.10)*.

Ajouter 5 cm^3 de solution tamponnée de pancréatine, agiter tout en maintenant le mélange réactionnel au bain thermostaté à 37 °C.

Noter le temps zéro qui correspond à l'addition de pancréatine, il correspond au déclenchement de la réaction.

Prélever, à la pipette, 5 cm^3 de milieu réactionnel toutes les minutes.

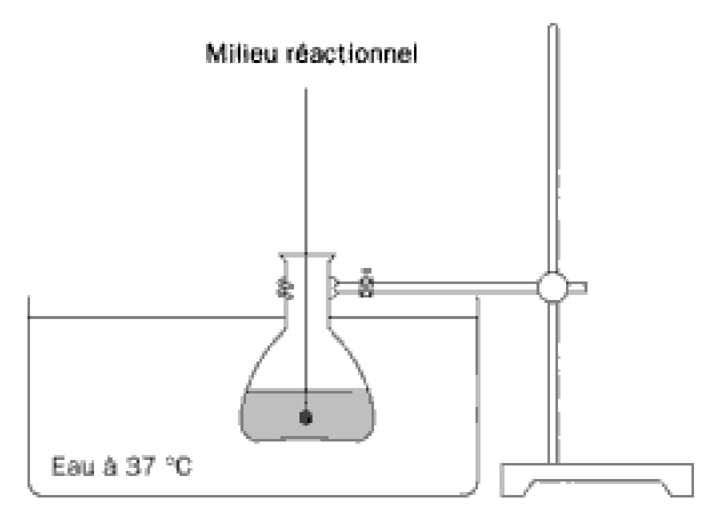


Figure 2.10. Montage utilisé pour la réaction d'hydrolyse de l'amidon.

Introduire chaque prélèvement dans un tube à essais contenant 5 gouttes de lugol.
Poursuivre chaque prélèvement jusqu'à ce que la coloration n'apparaisse plus. Noter la durée de l'opération (temps T).
Prélever alors 2 cm^3 de milieu réactionnel et vérifier à l'aide de la liqueur de Fehling l'apparition d'un pouvoir réducteur.
Dans un tube à essais, introduire :
– 2 cm^3 de solution de liqueur A de Fehling ;
– 2 cm^3 de solution de liqueur B de Fehling ;
– 2 cm^3 de milieu réactionnel.
Porter à ébullition, observer l'apparition d'un précipité rouge.
Quelle conclusion peut-on apporter à cette partie de l'expérience ?

■ ***Analyse des produits de la réaction par chromatographie sur couche mince***
En appliquant la technique de la manipulation « Chromatographie sur couche mince de glucides » (voir I.2.4), analyser les produits apparus dans le milieu réactionnel en fin d'expérience.
Déposer sur la chromatoplaque (3 dépôts successifs pour chacune des substances analysées) :
– la solution tamponnée de substrat (amidon) ;
– le milieu réactionnel en fin d'expérience ;
– la solution témoin de maltose à 5 g/L ;
– la solution témoin de glucose à 5 g/L.
Après révélation au réactif de Molisch, identifier le ou les produits de la réaction d'hydrolyse enzymatique de l'amidon.

Résultats, observations et interprétation

Que peut-on en conclure ?
Ce résultat est-il en accord avec les conclusions de la première partie de l'expérience ?

6.5. L'amidon, glucide caractéristique des réserves végétales

Mots clés

Amidon, amyloplaste, organe de réserve.

Principe

L'amidon, polysaccharide insoluble dans l'eau, résulte de l'activité photosynthétique des végétaux chlorophylliens ; il est une forme de réserve plus ou moins durable en fonction de la biologie de la plante considérée (plante annuelle, bisannuelle ou vivace), diversement localisée (*organes souterrains* : racines, rhizomes, tubercules ; *organes aériens* : tiges ligneuses avec leur parenchyme ligneux, etc.).
D'une façon générale, les amyloplastes élaborateurs d'amidon se rencontrent dans les tissus les plus variés, mais sont particulièrement abondants dans les « parenchymes de réserve ».
Ces plastes peuvent construire chacun un « grain d'amidon » unique ou plusieurs « grains » qui s'associent en un « grain composé ».
La taille et la morphologie des « grains d'amidon » sont variables mais assez constantes cependant pour être caractéristiques d'une espèce végétale donnée.
(Voir III.21.3.)

Sécurité

Cette manipulation ne présente aucun danger.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***
Tubercule de pomme de terre, grains de céréales (blé, avoine, orge, etc.), graine de haricot (ou autre Fabacée), à faire gonfler dans l'eau pendant quelques heures.

■ ***Matériel***
– Microscope (doté d'un dispositif polarisant).
– Lames et lamelles.
– Scalpel.
– Lame de rasoir.
– Aiguille lancéolée.

■ ***Réactifs***
Solution iodo-iodurée : mettre en solution 6 g d'iodure de potassium dans 100 mL d'eau distillée. Dissoudre ensuite 4 g d'iode bisublimé dans la solution obtenue. Conserver dans un flacon muni d'un bouchon en verre. Il est vivement conseillé de déterminer empiriquement la dilution la plus favorable pour un matériel donné, en particulier pour l'observation du contenu des amyloplastes avec leurs dépôts concentriques.

Mode opératoire

■ ***Technique d'observation***
• *Cas de la pomme de terre (Solanacées)*
A l'aide d'un scalpel, découper un fragment de tubercule de pomme de terre et gratter la pulpe. Laver le scalpel dans la goutte d'eau qui sert de réactif. Dès que celle-ci devient blanchâtre, elle contient assez d'amyloplastes pour envisager leur étude au microscope. Si les amyloplastes sont trop denses, remuer légèrement la lamelle afin de les disperser.
• *Cas de l'avoine et du blé (Graminées)*
Ici, l'amidon est localisé dans le caryopse (akène typique des Graminées caractérisé par la soudure de la paroi du fruit, ou péricarpe, et du tégument de la graine), au niveau duquel les amyloplastes sont accumulés sous le péricarpe dans l'albumen.
Sectionner un grain d'avoine ou de blé ; effectuer un grattage au scalpel de la partie farineuse blanche ainsi mise à jour. Comme pour le cas précédent, monter dans une goutte d'eau et observer au microscope.
• *Cas du haricot (Fabacées)*
Sectionner une graine de haricot (car c'est dans la graine que s'accumulent les réserves amylacées de cette plante annuelle). Gratter avec un scalpel la pulpe d'un cotylédon sur la partie visible sectionnée. Recueillir la poudre réalisée dans la goutte d'eau d'une lame. Recouvrir d'une lamelle qu'il convient de remuer doucement pour éparpiller les amyloplastes.

■ ***Coloration***
Le colorant caractéristique de l'amidon est le réactif iodo-ioduré. Une coloration ménagée, obtenue en installant une goutte du réactif sur la lame contre la lamelle pour permettre à celle-ci de pénétrer lentement par capillarité, montre des organites colorés en bleu violacé.
En effet, le centre du grain d'amidon est formé d'amylose colorable par le réactif en bleu tandis que le pourtour est de l'amylopectine, colorable en rouge, d'où la teinte globale bleu violacé.

Résultats, observations et interprétation

L'amidon au sein des amyloplastes présente une structure caractéristique avec des couches concentriques, alternativement sombres et claires, disposées autour d'un point plus ou moins central, le hile. Ces différences d'aspect sont dues à une différence dans le degré d'hydratation des différentes couches *(fig. 2.11A* à *G)*.

• **L'amidon de la pomme de terre**

Les amyloplastes à structure simple sont assez volumineux (160 µm en moyenne) et de forme ovoïde caractéristique *(fig. 2.11A)*.

Le premier dépôt d'amidon (ou hile) est excentré dans l'amyloplaste, si bien que les dépôts suivants, s'effectuant concentriquement au premier, accentuent la dissymétrie de l'organite ; ce dernier se présente bientôt formé de couches emboîtées, alternativement brillantes et mates en rapport avec une différence dans le degré d'hydratation des dépôts successifs (voir I.6.5).

L'observation au microscope en lumière polarisée fait constater que chaque grain présente le phénomène de la croix noire, ce qui traduit une structure microcristalline.

On observe aussi des grains semi-composés *(fig. 2.11B)*, plus petits et moins nombreux que les grains simples précédents. Ils résultent de la juxtaposition de deux ou trois amyloplastes. Lorsque le « grain » est double, une barre de contact sombre est nettement visible entre les deux amyloplastes.

Il existe également des grains composés *(fig. 2.11C)*, de même taille que les grains simples, mais moins nombreux. Ils proviennent de la mise en place simultanée de deux ou cinq hiles dans un même amyloplaste. Les premiers dépôts s'installent d'abord régulièrement autour de chaque hile, puis les autres dépôts se rejoignent et bientôt une première couche commune les englobe tous, puis une deuxième, etc.

Enfin, il est également possible d'apercevoir des grains corrodés *(fig. 2.11D)* que le végétal commence à utiliser ; cela traduit le changement de comportement métabolique de la pomme de terre avec l'époque ou les conditions de nutrition.

En effet, pendant la belle saison (printemps, été), le tubercule de la pomme de terre dont on a extrait les amyloplastes se formait : des oses synthéthisés quotidiennement dans les parties chlorophylliennes du pied de pomme de terre migraient au sein de la sève élaborée (sous forme de saccharose, etc.) dans les parenchymes des tiges souterraines (dont les extrémités se tubérisaient) où des amyloplastes les stockaient sous la forme polymérisée et stable de l'amidon.

Au printemps suivant, les nouveaux tubercules germent : chacun d'eux, isolé, doit alimenter ses jeunes bourgeons (les « yeux ») en utilisant ses propres réserves amylacées ; intervient alors une amylase, hydrolase capable de simplifier chimiquement l'amidon en molécules d'oses assimilables, nécessaires à la croissance d'un nouveau pied de pomme de terre.

A l'observation, ces grains corrodés présentent des vides irréguliers dans leur masse, leurs stries de croissance sont moins évidentes et leurs bords montrent des anfractuosités caractéristiques.

L'examen des amyloplastes contenus, cette fois-ci, dans les parenchymes des formes de résistance et de dissémination que sont les graines va confirmer certaines données précédentes et illustrer la diversité et la spécificité morphologique des amyloplastes au sein des espèces végétales.

• **L'amidon des céréales**

Rappelons que, ici, les amyloplastes sont contenus dans l'albumen nourricier, à proximité de la plantule, dans le caryopse. Les réserves amylacées seront utilisées lors de la germination.

Chez le blé, les amyloplastes sont petits (25 µm), discoïdes, de forme régulière avec un hile central et punctiforme *(fig. 2.11E)*.

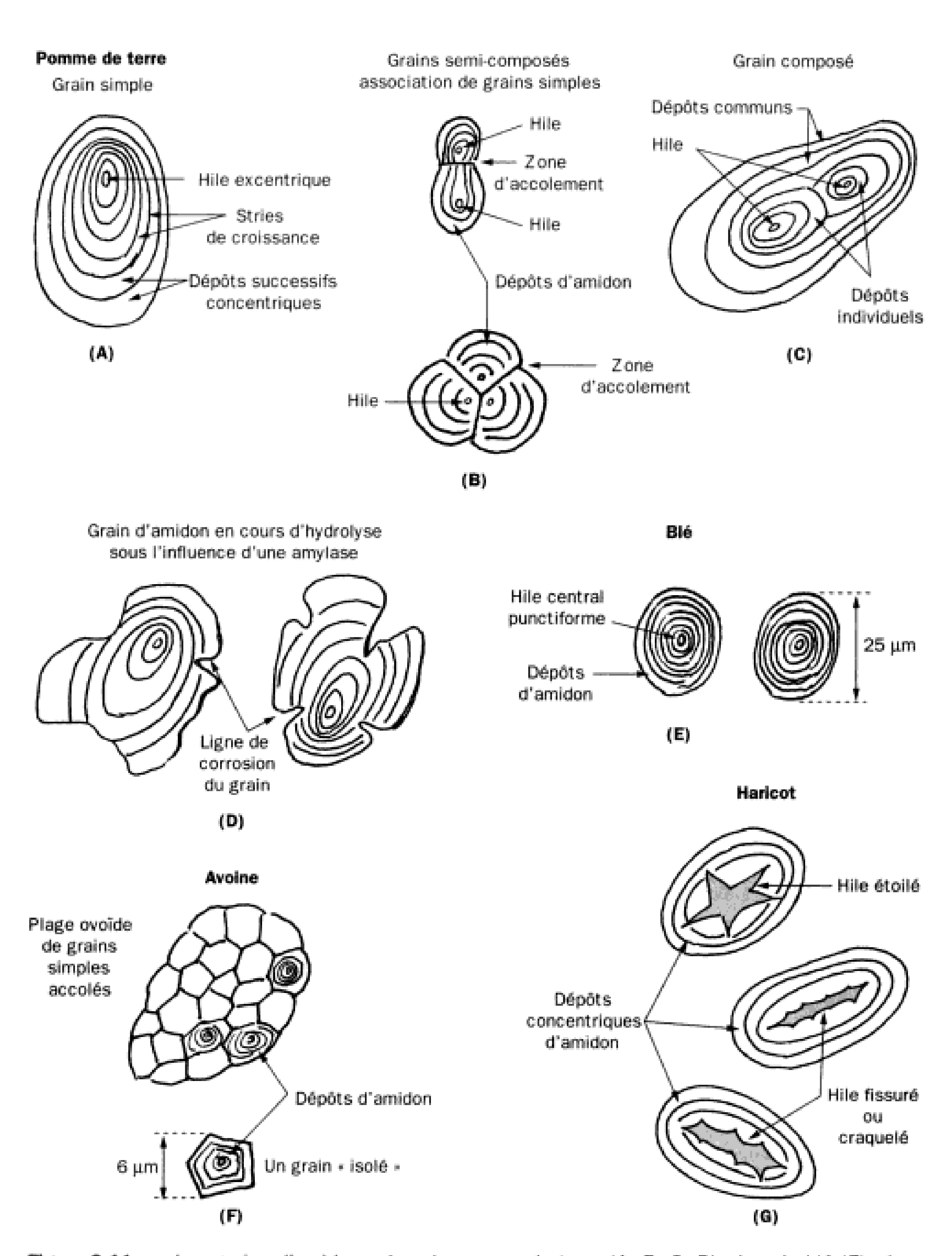


Figure 2.11. Les grains d'amidon : dans la pomme de terre (A, B, C, D), dans le blé (E), dans l'avoine (F) et dans le haricot (G).

Ceux de l'avoine sont encore plus petits (6 µm), de forme polyèdrique, car ils sont groupés en masses de taille variable et d'aspect ovalaire, par suite d'une juxtaposition des organites élémentaires *(fig. 2.11F)*.

• L'amidon du haricot

Comme chez les céréales précédentes, les amyloplastes sont contenus dans la graine, plus précisément dans les cotylédons de la plantule, qui ont ici consommé précocement les réserves initialement contenues dans l'albumen maintenant disparu.

Le stockage de l'amidon servira comme précédemment à la germination de la plantule : autrement dit, il sera digéré par la plantule au cours de la germination.

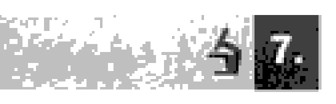
Les amyloplastes sont assez petits (75 µm), de taille homogène. Ils sont allongés avec un hile linéaire bien marqué (en creux dans l'amyloplaste) et de forme variable : tantôt il est allongé selon le grand axe de l'amyloplaste émettant des diverticules, tantôt il est plus central agrémenté de fissures étoilées *(fig. 2.11G)*.

Conclusion

L'amidon est un glucide insoluble dans l'eau ; il ne se rencontre donc pas dans la vacuole mais accumulé au sein d'un plaste spécifique, l'amyloplaste, dont il est le produit d'élaboration.

Ceci se déroule dans les parenchymes de réserve, localisés dans les tubercules, les rhizomes, les tiges ligneuses, les racines, les graines, etc.

Ce stockage de l'amidon n'est d'ailleurs que temporaire ; tôt ou tard, au printemps en général, à l'occasion de la germination des graines ou de la « germination » des tubercules, la reprise d'activité des végétaux concernés voit l'amyloplaste (prenant un aspect corrodé) hydrolyser ses réserves d'amidon en oses solubles qui servent ainsi de sources de matière et d'énergie pour les cellules en croissance.



7. L'inuline, glucide caractéristique des réserves végétales

Mots clés

Inuline, sphérocristal.

Principe

Les vacuoles végétales peuvent contenir des glucides solubles, l'inuline par exemple qui est une forme caractéristique de réserve, typiquement présente chez quelques familles évoluées d'Angiospermes comme les Composées, les Dipsacacées, etc.
L'inuline, polysaccharide voisin de l'amidon, présente deux caractères essentiels :
- soluble dans l'eau, l'inuline se trouve à l'état dissous dans le suc vacuolaire ;
- son hydrolyse libère du fructose ou lévulose, ose simple lévogyre, isomère du glucose dextrogyre.

Sécurité

Cette manipulation ne présente aucun danger.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

Morceaux de tubercule de dahlia, de topinambour, de racine de chicorée *(Composées)*, découpés à l'avance et conservés dans l'alcool à 80 %.

■ ***Matériel***

- Microscope.
- Lames et lamelles.
- Lame de rasoir.
- Aiguille lancéolée.

■ ***Réactifs***

- Glycérine anhydre.
- Eau alcoolisée.

Mode opératoire

L'inuline normalement dissoute dans les vacuoles est incolore et ne possède pas de colorant spécifique : elle est donc invisible sans traitement préalable.
Pour révéler sa présence dans les cellules végétales, il convient de faire appel à son insolubilité dans l'alcool.
Prendre des fragments de tubercule de dahlia conservés au préalable dans l'alcool à 80 %. De nombreuses cellules des fragments étudiés sont mortes : elles contiennent une très grande vacuole ayant accumulé de l'inuline.
Par osmose, l'alcool retire l'eau des vacuoles ; en conséquence, les cellules se déshydratent et l'inuline précipite.
A l'aide d'une lame de rasoir, faire quelques coupes fines dans un fragment, de préférence près de sa surface, pour observer la cristallisation de l'inuline.
Employer la glycérine anhydre pour le montage entre lame et lamelle ; la précipitation est assez lente mais donne une structure cristalline nette que l'on rend encore plus visible

en traitant ensuite par de l'eau alcoolisée qui dissout la substance interposée entre les aiguilles cristallines.

Résultats, observations et interprétation

L'inuline précipite sous forme de cristaux isolés mais, très vite, ils se regroupent en amas plus ou moins volumineux le long des parois squelettiques. Il semble que ces parois soient le point de fixation aux nombreux petits cristaux en éventail qui s'associent en des rosaces ou sphérocristaux *(fig. 2.12)*.

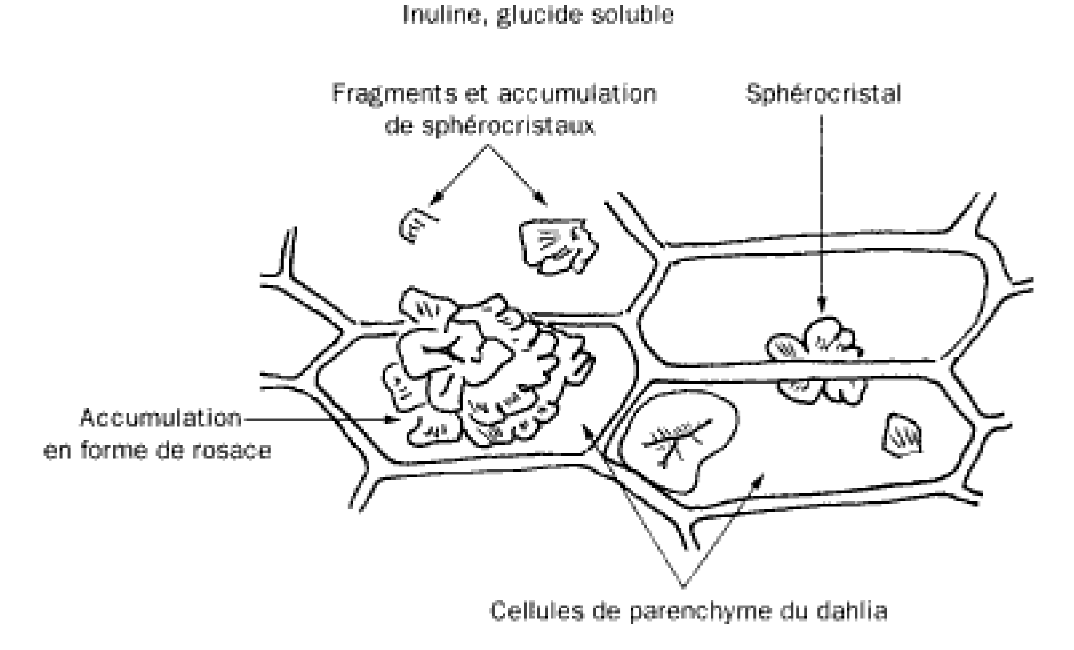


Figure 2.12. L'inuline chez le dahlia *(Composées)*.

La préparation n'est pas toujours apte à l'observation :
- si la précipitation est défectueuse, l'inuline apparaît sous forme de granules et non sous forme de sphérocristaux ;
- parfois, on n'observe rien et deux causes peuvent être alors envisagées : soit il y a eu resolubilisation de l'inuline, soit l'échantillon utilisé est pratiquement dépourvu d'inuline ;
- au contraire, la précipitation peut être telle que les sphérocristaux forment une masse réfringente difficile à identifier.

L'hydrolyse de l'inuline donne naissance à du fructose.

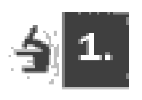
Conclusion

Chez les *Composées* comme le dahlia, les réserves d'inuline contenues dans les racines tubérisées seront utilisées, à la manière de l'amidon mentionné précédemment, lors de la reprise d'activité de ces dernières, au printemps suivant.



Les constituants azotés de la matière vivante

Sommaire



1. Caractérisation des acides aminés issus de l'hydrolyse de la sérum-albumine par les protéases pancréatiques

Mots clés

Acides aminés, hydrolyse enzymatique de la sérum albumine, réactions de caractérisation des acides aminés.

Principe

Les réactions de caractérisation des acides aminés sont pratiquées sur des solutions témoins d'acides aminés et sur un hydrolysat protéique (la sérum-albumine), sous l'influence des protéases pancréatiques (trypsine et chymotrypsine).
Les fragments sont des acides aminés ou des petits peptides.
Les protéines résiduelles sont éliminées par insolubilisation à l'aide de l'acide trichloracétique et filtration.
Les réactions colorées des acides aminés sont utilisées en vue de leur dosage et afin de les révéler en chromatographie de surface (papier et couche mince).

Sécurité

Sur le plan de la sécurité, aucun des réactifs ne doit être pipeté à la bouche.
C'est le cas de la solution de ninhydrine qui est un réactif nocif et irritant. Il est placé dans la classe 3 de la classification toxicologique helvétique (poison puissant).
L'acide nitrique concentré et chaud doit être manipulé avec de grandes précautions, c'est un acide fort, oxydant et corrosif, placé dans la classe 2 de la classification toxicologique helvétique (poison très puissant).
Le réactif de Millon est particulièrement dangereux à manipuler, mélange de mercure, toxique, placé dans la classe 2 de la classification toxicologique helvétique (poison très puissant) et d'acide nitrique.
L'acide trichloracétique, nocif et irritant, est à manipuler avec précaution, il est placé dans la classe 2 de la classification toxicologique helvétique (poison très puissant).
L'acide sulfurique concentré est à manipuler avec des lunettes de protection, une blouse de coton fermée. Il est placé dans la classe 1 de la classification toxicologique helvétique.
Le réactif glyoxylique contient du chloral hydraté qui est toxique et irritant.
L'hydroxyde de potassium est corrosif et placé dans la classe 2 de la classification toxicologique helvétique (poison très puissant).
Le naphtol-1 est nocif et irritant (classe 2). L'urée est très peu toxique (classe 5).
Le brome qui sert à préparer le réactif à l'hypobromite est très toxique et irritant, c'est un gaz qui doit être manipulé sous hotte ventilée.

Matière d'œuvre

Matériel biologique

– Solution de pancréatine à 1 g pour 100 cm^3 de tampon phosphate pH 8,3.
– Solution de sérum-albumine à 10 g/L dans l'eau physiologique (NaCl à 9 g/L).

Réactifs

– Tampon phosphate pH 8,3.
– Solution d'acide trichloracétique à 30 g/L.

– Solution de glycine à 5 g/L.
– Solution de proline à 5 g/L.
– Solution fraîche de ninhydrine à 5 g/L dans l'éthanol à 95 volumes.
– Solution saturée de tyrosine.
– Solution de tryptophane à 5 g/L.
– Réactif de Millon : ajouter 20 g d'acide nitrique concentré (d = 1,38) à 20 g de mercure. Dissoudre à froid. Ajouter après dissolution 2 volumes d'eau distillée, laisser reposer 24 heures et décanter.
– Acide sulfurique concentré.
– Réactif glyoxylique : dissoudre 5 g de chloral hydraté pur cristallisé dans 20 à 30 cm^3 d'eau distillée. Ajouter 5 g de carbonate de calcium pur. Faire bouillir, filtrer aussitôt. Ajuster à 100 cm^3 avec de l'eau distillée.
– Solution de KOH à 100 g/L.
– Solution de naphtol-1 à 1 g/L.
– Solution d'urée à 50 g/L.
– Solution d'hypobromite : ajouter 2 g de brome à 100 cm^3 de NaOH à 5 g/L. Opérer sous une hotte pour éviter de respirer les vapeurs de brome.

■ ***Matériel***
– Un bain thermostaté réglé à 37 °C.
– Un portoir métallique de tubes à essais.
– Douze tubes à essais.
– Une fiole erlenmeyer de 100 cm^3.
– Deux pipettes de 5 cm^3 munies de poire d'aspiration.
– Trois pipettes de 2 cm^3.
– Quatre pipettes de 1 cm^3.
– Une pipette compte-gouttes.
– Une éprouvette de 10 cm^3.
– Un becher de 250 cm^3 qui sert de bain-marie bouillant.
– Une pipette de 5 cm^3.
– Une poire d'aspiration.

Mode opératoire

■ ***Hydrolyse enzymatique de la sérum-albumine par les protéases pancréatiques***
Dans une fiole erlenmeyer de 100 cm^3, introduire :
– 25 cm^3 de solution de sérum albumine à 10 g/L ;
– 10 cm^3 de tampon phosphate pH 8,3 ;
– 5 cm^3 de solution de pancréatine tamponnée à pH 8,3.
Agiter et placer la fiole dans le bain thermostaté à 37 °C, pendant 45 minutes.
Au terme de cette incubation, tester l'hydrolyse de la protéine, comparativement à un témoin.
Essai : dans un tube à essais, introduire 10 cm^3 d'hydrolysat de sérum-albumine, ajouter 1 cm^3 de solution d'acide trichloracétique à 30 g/L.
Témoin : dans un tube à essais, introduire 6,25 cm^3 de solution de sérum-albumine à 10 g/L, 2,5 cm^3 de tampon phosphate pH 8,3 et 1,25 cm^3 d'eau distillée.
L'apparition d'un précipité blanc indique la présence de protéines (sérum-albumine non hydrolysée ou protéines de l'extrait pancréatique).
Un faible précipité dans l'essai prouve une hydrolyse de sérum-albumine. L'hydrolysat contient des acides aminés et des petits peptides.

■ ***Réaction à la ninhydrine, réaction caractéristique générale des acides aminés***

La ninhydrine, en excès et à chaud, réagit avec les acides α-aminés en développant une coloration violette. Cette réaction sert à caractériser et doser les acides aminés. Un seul acide aminé réagit de façon particulière, c'est la proline qui donne une coloration jaune.

Sa spécificité n'est pas absolue puisqu'un certain nombre d'amines primaires réagissent également.

Prendre 3 tubes à essais. Dans le premier verser 2 cm^3 de solution de glycine à 5 g/L, dans le deuxième verser 2 cm^3 de solution de proline à 5 g/L, dans le troisième verser 2 cm^3 d'hydrolysat protéique.

Ajouter à chacun des tubes 5 gouttes de solution de ninhydrine à 10 g/L. Porter au bain-marie bouillant pendant 1 minute.

Observer la coloration violette avec la glycine et l'hydrolysat protéique et la coloration jaune avec la proline.

■ ***Réaction xanthoprotéique***

Cette réaction est caractéristique des acides aminés possédant un noyau aromatique. L'acide nitrique réagit sur les cycles aromatiques en formant des dérivés nitrés de substitution de couleur jaune.

Prendre 2 tubes à essais. Dans le premier, verser 1 cm^3 de solution saturée de tyrosine, dans le second 1 cm^3 d'hydrolysat protéique.

Ajouter à chacun d'eux 1 cm^3 d'acide nitrique concentré. Porter à ébullition. Observer une coloration jaune.

■ ***Réaction de Millon***

Cette réaction est caractéristique de la fonction phénol de la tyrosine. Il se forme des dérivés nitrosés rouges avec le réactif de Millon.

Prendre 2 tubes à essais. Introduire dans le premier 2 cm^3 de solution saturée de tyrosine et dans le second 2 cm^3 d'hydrolysat protéique.

Ajouter dans chacun d'eux 1 cm^3 de réactif de Millon.

Chauffer doucement. Observer une coloration rouge.

■ ***Réaction d'Adamkiewicz-Hopkins***

Cette réaction est caractéristique du noyau indole, donc du tryptophane. Les composés indoliques, donnent avec certains aldéhydes (acide glyoxylique, paradiméthylamino-benzaldéhyde, méthanal, etc.), une coloration violette en milieu acide et à froid. Cette réaction porte le nom d'Erlich-Kovacs lorsqu'elle est réalisée avec le paradiméthylamino-benzaldéhyde.

Prendre 2 tubes à essais. Dans le premier introduire 1 cm^3 de solution de tryptophane à 5 g/L, dans le second 1 cm^3 d'hydrolysat protéique.

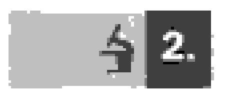
Ajouter à chacun d'eux 1 cm^3 de réactif glyoxylique et 2 cm^3 d'acide sulfurique concentré. Observer la coloration violette.

■ ***Réaction de Sakaguchi***

Cette réaction est utilisée pour caractériser l'arginine.

Prendre 2 tubes à essais. Dans le premier introduire 5 cm^3 de solution de tryptophane à 5 g/L, dans le second 5 cm^3 d'hydrolysat protéique. Ajouter à chacun d'eux 1 cm^3 de solution d'hydroxyde de potassium à 100 g/L, 2 cm^3 de solution de naphtol-1 à 1 g/L, 1 cm^3 de solution d'urée à 50 g/L.

Agiter, puis ajouter 1 cm^3 de solution d'hypobromite. Observer une coloration rouge.



2. Réactions de caractérisation et de précipitation des protéines

Mots clés

Protéines, réactions de caractérisation et de précipitation.

Sécurité

Ces réactions font manipuler des bases fortes, des acides forts et des solutions de sels de métaux lourds. Ils ne doivent pas être pipetés à la bouche et leur utilisation doit être faite avec les précautions d'usage : lunettes de protection et port d'une blouse de coton fermée.
La lessive de soude, solution concentrée d'hydroxyde de sodium, corrosive, est placée dans la classe 2 de la classification toxicologique helvétique (poison très puissant).
L'acide acétique, irritant, est placé dans la classe 3 (poison puissant).
L'acide nitrique concentré est un acide fort, oxydant et corrosif, placé dans la classe 2 de la classification toxicologique helvétique (poison très puissant).
L'acide trichloracétique est corrosif, placé dans la classe 2 (poison très puissant).
Le sulfate cuivrique, nocif et irritant, est placé dans la classe 3 (poison puissant).
Le chlorure mercurique du réactif de Tanret est très toxique et corrosif, il est placé dans la classe 2 de la classification toxicologique helvétique (poison très puissant).
Le sulfate de magnésium et le sulfate d'ammonium ne sont pas dangereux.
La manipulation du sérum animal (cheval ou porc) doit être faite dans des conditions d'asepsie totale (pas de pipetage à la bouche, utilisation de gants de caoutchouc à usage unique, désinfection des pipettes et récipient à l'eau de Javel).

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***
- Solution de blanc d'œuf diluée au 1/10 dans de l'eau physiologique (solution de NaCl à 9 g/L).
- Sérum animal (cheval, porc) obtenu dans un abattoir.

■ ***Réactifs***
- Lessive de soude (solution concentrée d'hydroxyde de sodium).
- Solution de sulfate cuivrique à 10 g/L.
- Lessive de soude diluée au 1/10.
- Acide acétique dilué au 1/10.
- Acide nitrique concentré.
- Solution d'acide trichloracétique à 300 g/L.
- Réactif de Tanret : à 3,32 g d'iodure de potassium pur cristallisé, ajouter 1,35 g de chlorure mercurique pur et 20 cm^3 d'acide acétique cristallisable. Ajuster à 60 cm^3 avec de l'eau distillée.
- Sulfate de magnésium cristallisé.
- Solution saturée de sulfate d'ammonium.
- Sulfate d'ammonium cristallisé.
- Ethanol à 95 volumes.

■ ***Matériel***
- Tubes à essais.
- Quatre pipettes de 1 cm^3.

– Une pipette de 2 cm^3.
– Deux pipettes de 5 cm^3.
– Une poire d'aspiration.
– Une éprouvette de 10 cm^3.
– Une pipette compte-gouttes.
– Un dispositif de filtration : petit entonnoir de verre et filtre plissé.

Mode opératoire

■ ***Caractérisation des protéines par la réaction du biuret***
Cette réaction caractérise la liaison peptidique ; elle s'applique donc à la caractérisation des protéines et des peptides (à condition que ces derniers comportent au moins cinq acides aminés).
Il existe une variante de cette réaction qui se prête à un dosage colorimétrique des protéines, c'est la méthode de Gornall (voir I.3.3).
A 2 cm^3 d'une solution de blanc d'œuf dilué au 1/10, ajouter 4 cm^3 de lessive de soude (solution concentrée d'hydroxyde de sodium) et 5 gouttes d'une solution de sulfate cuivrique à 10 g/L.
Observer le développement d'une coloration violette. Ne pas confondre avec l'apparition éventuelle d'un précipité bleu d'hydroxyde cuivrique [$Cu(OH)_2$].

■ ***Thermocoagulation***
La plupart des protéines précipitent, dénaturées, par chauffage à ébullition de leur solution (il existe des exceptions : la caséine en milieu neutre par exemple). Un pH neutre ou légèrement acide est nécessaire à la thermocoagulation.
Verser dans un tube à essais, 5 cm^3 de solution de blanc d'œuf diluée au 1/10, alcaliniser par addition d'une goutte de lessive de soude diluée au 1/10.
Porter à ébullition. Observer l'absence de précipité. Acidifier la solution chaude par de l'acide acétique dilué au 1/10. Observer l'apparition d'un précipité de coagulation.

■ ***Précipitation par les acides forts***
Les acides forts, ajoutés à une solution protéique, provoquent une dénaturation irréversible des protéines par la baisse brutale du pH qu'ils provoquent.
• *Acides minéraux*
Dans un tube à essais, introduire 2 cm^3 de solution diluée au 1/10 de blanc d'œuf, ajouter, sans mélanger, 1 cm^3 d'acide nitrique concentré au fond du tube. Observer l'anneau de floculation. Cet anneau est jaune, pourquoi ?
• *Acides organiques*
Opérer de même avec une solution d'acide trichloracétique à 300 g/L.

■ ***Précipitation par les sels de métaux lourds***
Les sels contenant des métaux lourds (Pb^{2+}, Hg^{2+}, Fe^{3+}, Cd^{2+}, Zn^{2+}, etc.) dénaturent les protéines. On utilise souvent le réactif de Tanret (solution acétique de tétra-iodomercuratell de potassium) pour précipiter les protéines.
A 1 cm^3 de solution diluée au 1/10 de blanc d'œuf, ajouter 1 cm^3 de réactif de Tanret. Observer un précipité.

■ ***Précipitation sans dénaturation par les sels neutres, le relargage des protéines***
Les protéines sont précipitées par les sels neutres, à température ambiante, sans dénaturation. La précipitation dépend de la nature et de la concentration du sel, de la nature de la protéine, du pH du milieu.

• *Séparation de l'albumine et des globulines sériques par le sulfate de magnésium*
Dans un tube à essais, verser 5 cm^3 de sérum animal (cheval ou porc). Saturer par du sulfate de magnésium cristallisé. Observer un floculat surnageant de globulines. Filtrer. Acidifier le filtrat. Observer un floculat d'albumine sérique.
• *Séparation de l'albumine et des globulines sériques par le sulfate d'ammonium*
Dans un tube à essais, verser 5 cm^3 de sérum animal. Ajouter 5 cm^3 de solution saturée de sulfate d'ammonium. Observer un floculat de globulines. Filtrer. Saturer le filtrat par du sulfate d'ammonium cristallisé. Observer un floculat d'albumine.

■ ***Précipitation par les solvants organiques miscibles à l'eau***
Les solvants organiques miscibles à l'eau : éthanol et acétone, précipitent les protéines. Cette précipitation s'accompagne d'une dénaturation à température ambiante. Si l'on opère à froid (4 °C), la précipitation n'est pas dénaturante.
Dans un tube à essais, introduire 2 cm^3 de solution diluée au 1/10 de blanc d'œuf, ajouter 1 cm^3 d'éthanol à 95 volumes. Observer un précipité.

3. La réaction du biuret et ses applications analytiques : dosage des protéines du blanc d'œuf

Mots clés

Ovalbumine, dosage, réactif de Gornall.

Principe

La composition moyenne du blanc d'œuf (pourcentage en masse) est :
- eau : 85,0
- protéines : 12,9
- lipides : 0,3
- glucides : 0,8
- sels minéraux : 1,0

Le but de cette manipulation est de doser les protéines du blanc d'œuf par la méthode de Gornall, qui est l'application analytique de la réaction du biuret.
La réaction du biuret est ainsi appelée car le biuret (H_2N-CO-NH-CO-NH_2) donne une réponse positive dans les conditions de la réaction.
En milieu alcalin, les composés contenant au moins deux groupements -CO-NH- ou -CO-NH_2 voisins forment avec les ions cuivriques Cu^{2+} un complexe bleu violet.
Cette coloration est caractéristique des peptides de complexité suffisante (il faut au moins 4 liaisons peptidiques) et des protéines. L'intensité de la teinte varie avec le nombre de liaisons peptidiques.
La loi de Beer-Lambert s'applique si les concentrations en protéines n'excèdent pas 10 mg/cm^3.
Le réactif de Gornall est très alcalin afin de solubiliser les protéines dénaturées. La présence de tartrate double de sodium et de potassium évite la précipitation de l'hydroxyde cuivrique [$Cu(OH)_2$].
Le maximum d'absorption se situe entre 530 et 540 nm.

Sécurité

Le réactif de Gornall ne doit pas être pipeté à la bouche, le sulfate de cuivre qu'il contient est toxique et placé dans la classe 3 de la classification toxicologique helvétique (poison puissant). En outre, ce réactif est fortement alcalin, la soude qui entre dans sa composition est placée dans la classe 2 de la classification toxicologique helvétique.

Matière d'œuvre

■ *Matériel biologique*

Œuf de poule.

■ *Réactifs*

- Réactif de Gornall :
  - sulfate de cuivre, 5 H_2O 1,50 g
  - tartrate double de sodium et de potassium 6 g
  - soude 30 g
  - iodure de potassium 1 g
  - eau distillée 1 000 cm^3

  Réactif à conserver à l'abri de la lumière, dans un flacon en polyéthylène soigneusement bouché.

– Eau physiologique (NaCl à 9 g /L).
– Solution étalon de sérum-albumine 5 g/L (on choisit de préférence la sérum-albumine qui est plus soluble que l'ovalbumine).

■ ***Matériel***
– Huit tubes à essais.
– Deux pipettes graduées de 1 cm^3.
– Deux pipettes jaugées de 1 cm^3.
– Une pipette graduée de 5 cm^3 ou un distributeur de 5 cm^3.
– Une poire d'aspiration.
– Une fiole jaugée de 250 cm^3.
– Une spectrophotomètre.

Mode opératoire

Casser l'œuf, séparer le blanc du jaune, recueillir le blanc.
Faire une dilution au 1/50 du blanc d'œuf dans de l'eau physiologique (NaCl à 9 g/L).
Faire un dosage colorimétrique conformément au *tableau 3.I*.

Tableau 3.I Préparation du dosage colorimétrique.

Tube n°	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**E_1**	**E_2**
Solution diluée de blanc d'œuf au 1/50 dans l'eau physiologique (en cm^3)							1	1
Solution étalon de sérum-albumine à 5 g/L (en cm^3)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1		
Eau physiologique (solution de NaCl à 9 g/L) (en cm^3)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0	0	0
Réactif cupro-tartrique de Gornall (en cm^3)	4	4	4	4	4	4	4	4
Protéines en mg/tube	0	1	2	3	4	5	X_1	X_2
Absorbance mesurée à 540 nm	0						A_1	A_2

Mélanger. Attendre la stabilisation de la coloration, 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité. La coloration est stable plusieurs heures.
Lire à 540 nm les absorbances de chacun des tubes contre le blanc de gamme (tube 0).

Résultats, observations et interprétation

Tracer la courbe d'étalonnage A_{540} = f (masse de protéines en mg/tube). Reporter sur cette courbe les absorbances mesurées pour les essais. En déduire la masse X de protéines en mg par tube pour chacun des essais.
La teneur d'ovalbumine du blanc d'œuf est égale à :

$$\rho = 50 \times X \text{g d'OAB/litre de blanc d'œuf.}$$



4. Etude comparée de la teneur en protéines du lait de vache et du lait de femme

Mots clés

Lait de femme et lait de vache, dosage des protéines par la méthode de Kjeldahl.

Principe

Le lait de vache et le lait de femme ont des compositions différentes.

	Lait de vache	Lait de femme
Protides totaux (g/L)	34	14
Lactose (g/L)	49	72
Lipides (g/L)	35	37
Sels minéraux (g/L)	7	2
Eau (g)	900	880

Les teneurs fort différentes en caséine posent des problèmes de digestibilité du lait de vache par les bébés. La caséine du lait de vache coagule dans l'estomac des bébés sous l'effet du pH et des enzymes gastriques. Le lait de vache coagule en formant un caillot volumineux et compact alors que le lait de femme forme un caillot divisé et peu abondant. La maternisation (laits de 1er âge) du lait de vache consiste en particulier à diminuer la teneur en protéines et à augmenter celle en lactose.
Cette manipulation a pour but de comparer les teneurs en protéines totales des deux laits. Pour cela, on dose l'azote total du lait par la méthode de Kjeldahl, et on estime la teneur en protéine en admettant que les autres composés azotés du lait sont négligeables (ils représentent environ 3 % de l'azote total du lait) et que les protéines du lait contiennent en moyenne 15,6 % d'azote.

■ ***Minéralisation***

Dans la méthode de Kjeldahl, on minéralise la matière organique par l'acide sulfurique concentré et bouillant. Le carbone, l'hydrogène et l'oxygène sont minéralisés à l'état de dioxyde de carbone et d'eau. L'azote moléculaire n'est pas oxydé, il est libéré à l'état d'ammoniac qui, en milieu sulfurique, se retrouve à l'état d'ion ammonium.

$$\begin{matrix} C \\ H \\ O \end{matrix} \rightarrow CO_2 + H_2O$$

$$N \rightarrow NH_3 \xrightarrow{H^+} NH_4^+$$

L'acide sulfurique se décompose partiellement et dégage du dioxyde et trioxyde de soufre (SO_2 et SO_3), fumées blanches très irritantes. La minéralisation doit être réalisée avec une aspiration des fumées ou sous une hotte ventilée.
Pour accélérer la minéralisation, on ajoute du sulfate de potassium qui élève le point d'ébullition de l'acide sulfurique et un catalyseur.
Il est nécessaire de maintenir la minéralisation 15 à 20 minutes après la décoloration du contenu du matras, la minéralisation du carbone étant plus rapide que celle de l'azote.

■ ***Entraînement de l'ammoniac***

Le contenu du matras, refroidi, est dilué et alcalinisé par une quantité suffisante de lessive de soude (solution concentrée d'hydroxyde de sodium).

$$NH_4^+ + OH^- \rightarrow NH_3\nearrow + H_2O$$

Cette phase est délicate car l'ammoniac est un gaz très volatil, les risques de perte sont importants.

■ ***Dosage de l'ammoniac***

L'ammoniac est distillé et dosé au fur et à mesure de son entraînement, dans une solution d'acide borique qui fixe l'ammoniac sans interférer sur le dosage acidimétrique.
L'indicateur utilisé est l'indicateur de Tashiro, mélange de rouge de méthyle et de bleu de méthylène. Cet indicateur est violet pour des pH inférieurs à 4,2, vert pour des pH supérieurs à 6,2. La teinte sensible indiquant le terme du dosage est gris sale.

Sécurité

Cette manipulation est relativement dangereuse, puisqu'il faut porter à ébullition de l'acide sulfurique concentré (classe 1 de la classification toxicologique helvétique). Le port des lunettes de protection est obligatoire et le port de gants conseillé. Aucun pipetage ne doit être effectué à la bouche. Il est capital de porter une blouse de coton fermée.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

- Lait de vache.
- Lait maternisé premier âge.

■ ***Réactifs***

- Acide sulfurique concentré.
- Sulfate de potassium.
- Catalyseur de minéralisation Prolabo.
- Acide sulfurique titré C_{H^+} (titre connu et voisin de 0,05 mol/L.
- Lessive de soude (solution concentrée d'hydroxyde de sodium).
- Solution d'acide borique à 40 g/L.
- Réactif de Tashiro : mélanger une solution de rouge de méthyle à 0,5 g/L dans l'éthanol à 95 volumes avec une solution de bleu de méthylène à 1 g/L.

■ ***Matériel***

- Appareil à distiller de Kjeldahl.
- Rampe de minéralisation.
- Deux matras de minéralisation de 100 cm^3.
- Une pipette de 5 cm^3.
- Une poire d'aspiration.
- Une éprouvette de 20 cm^3.
- Billes de verre.
- Une éprouvette de 100 cm^3.
- Une burette de 25 cm^3 graduée au 1/10 de cm^3.
- Une pince en bois.

Mode opératoire

■ ***Minéralisation***

Rappel : elle doit être réalisée avec précaution car elle met en œuvre de l'acide sulfurique concentré et bouillant.

Réaliser deux essais en parallèle, l'un avec du lait de vache soigneusement homogénéisé, l'autre avec du lait maternisé premier âge en poudre, mis en solution.

Dans un matras de 100 cm^3, introduire :

– 5 cm^3 de lait (versé à l'aide d'une pipette jaugée 2 traits) ;
– 4 g de sulfate de potassium ;
– une pointe de spatule de catalyseur de minéralisation Prolabo ;
– une bille de verre ;
– 15 cm^3 d'acide sulfurique concentré (versé à l'aide d'une éprouvette).

Agiter et placer le matras sur la rampe de minéralisation, le col placé dans le dispositif d'aspiration des vapeurs.

Chauffer d'abord doucement, puis augmenter le chauffage jusqu'à douce ébullition du mélange. Veiller à ce que le contenu du matras ne s'élève pas dans le col en moussant. Agiter périodiquement de manière à ramener dans le fond du matras les parcelles qui adhèrent aux parois.

Lorsque le liquide est devenu limpide, poursuivre le chauffage pendant 15 à 20 minutes, en diminuant l'allure de chauffe. Laisser refroidir avant toute autre manipulation.

■ ***Distillation et dosage de l'ammoniac***

Monter l'appareil à distiller de Kjeldahl *(fig. 3.1)*.

Diluer le contenu du matras de minéralisation par addition de 30 à 50 cm^3 d'eau distillée (si la dissolution est difficile, tiédir légèrement). Le transvaser dans le ballon de l'appareil à distiller. Joindre les eaux de rinçage (400 cm^3 environ).

Ajuster l'allonge au réfrigérant de façon à ce qu'elle plonge au fond d'une capsule de porcelaine contenant 20 cm^3 de solution d'acide borique à 40 g/L et 3 à 4 gouttes d'indicateur de Tashiro.

Mettre en place la burette contenant une solution d'acide sulfurique titré (titre connu C_{H^+} voisin de 0,05 mol/L).

Alcaliniser le contenu du ballon à distiller en ajoutant 65 cm^3 de lessive de soude (solution concentrée d'hydroxyde de sodium). Adapter aussitôt le ballon à l'appareil à distiller de manière à éviter toute perte d'ammoniac.

Distiller en chauffant modérément et régulièrement. L'entraînement de l'ammoniac se produit très rapidement, l'indicateur vire à sa teinte alcaline (verte). Rétablir et maintenir tout au long de la distillation la teinte de virage (gris sale), par addition d'acide sulfurique titré.

Le dosage est considéré comme terminé lorsque la teinte de virage se maintient stable pendant 5 minutes de distillation.

Soit V la chute de burette obtenue en cm^3.

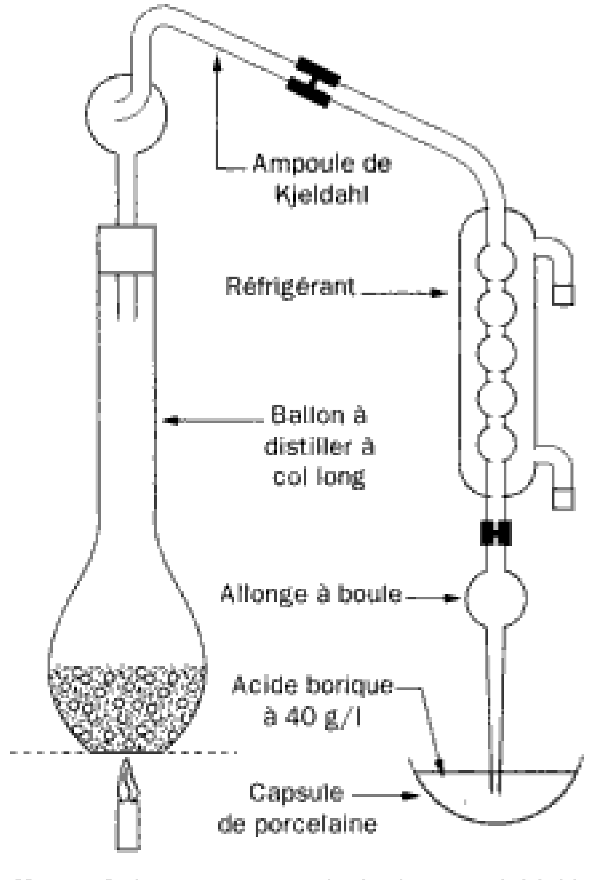


Figure 3.1. Appareil à distiller de Kjeldahl.

Résultats, observations et interprétation

La teneur en azote total du lait est égale à :

$$\rho = C_{H^+} \times 2 \times V \times \frac{14}{5} \text{ g d'azote par litre de lait.}$$

C_{H^+} : titre molaire de la solution d'acide sulfurique titré.
V : chute de burette obtenue.

La teneur en protéines du lait est égale à :

$$\rho' = \rho \times \frac{100}{15,6} \text{ g par litre de lait.}$$

Comparer les teneurs des deux laits en protéines et justifier la nécessité de « materniser » le lait de vache donné aux nourrissons.



5. Séparation électrophorétique des acides aminés d'un jus de fruit

Mots clés

Acides aminés, électrophorèse, jus de fruit.

Principe

L'électrophorèse est une méthode d'analyse fondée sur la migration différentielle de particules chargées électriquement, sous l'influence d'un champ électrique constant.
Les acides aminés sont des molécules amphotères, leur état ionique dépend du pH *(fig. 3.2)*.

	$H_3\overset{+}{N}-CH(R)-COOH$ $\underset{K_1}{\rightleftharpoons}$ H^+	$H_3\overset{+}{N}-CH(R)-COO^-$ $\underset{K_2}{\rightleftharpoons}$ H^+	$H_2N-CH(R)-COO^-$
Etat ionique	A^+	$A^\pm$	A^-
pH	pH < pHi	pH = pHi	pH > pHi
Charge nette	+ 1	0	– 1

Figure 3.2. Etats ioniques d'un acide aminé neutre en fonction du pH.

Si l'électrophorèse est pratiquée à un pH égal au pHi ou situé dans la zone de pHi, l'acide aminé est sous forme de bi-ion, sa charge nette est nulle, il ne migre pas.
Si l'électrophorèse est pratiquée à un pH inférieur au pHi, l'acide aminé est sous forme de cation (charge nette positive), il migre vers la cathode.
Si l'électrophorèse est pratiquée à un pH supérieur au pHi, l'acide aminé est sous forme d'anion (charge nette négative), il migre vers l'anode.
La manipulation consiste à séparer les acides aminés libres contenus dans un jus d'orange et ceux d'un mélange de lysine, acide aminé basique (pHi > au pH du milieu), de glycine, acide aminé neutre (pHi = pH du milieu) et d'acide aspartique (pHi < pH du milieu).

Sécurité

Le danger de cette manipulation est la mise sous tension de la cuve électrophorétique (150 V).
La solution de ninhydrine, relativement toxique puisque ce réactif est placé dans la classe 3 de la classification toxicologique helvétique (poison puissant), doit être pulvérisée sous hotte ventilée.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***
Filtrat de jus d'orange.

■ ***Réactifs***
- Solution tampon phosphate pH 6,1 : mélanger 15 cm^3 de solution de Na_2HPO_4 anhydre à 9,46 g/L, avec 85 cm^3 de solution de KH_2PO_4 anhydre à 9,06 g/L.

– Mélange témoin d'acides aminés : acide aspartique à saturation, glycine : 2 g/L, lysine 2 g/L.
– Révélateur à la ninhydrine : solution de ninhydrine à 2 g/L dans le butanol. A conserver au réfrigérateur en flacon brun.

■ ***Matériel***

– Un générateur d'électrophorèse.
– Une cuve d'électrophorèse.
– Deux bandes de papier Whatman n° 1, aux dimensions compatibles avec la cuve.
– Deux pipettes capillaires préparées par étirage de cannes de verre.

Mode opératoire

Remplir chaque compartiment de la cuve avec le même volume de tampon. Veiller à ne pas laisser de solution sur la cloison séparant les deux compartiments de la cuve.
Découper deux bandes de papier Whatman n° 1 de 3 cm de large, et de L cm de long. La longueur L de chaque bande est déterminée en fonction de la géométrie de la cuve *(fig. 3.3)*.
Eviter les traces de doigt au cours de la manipulation des bandes.

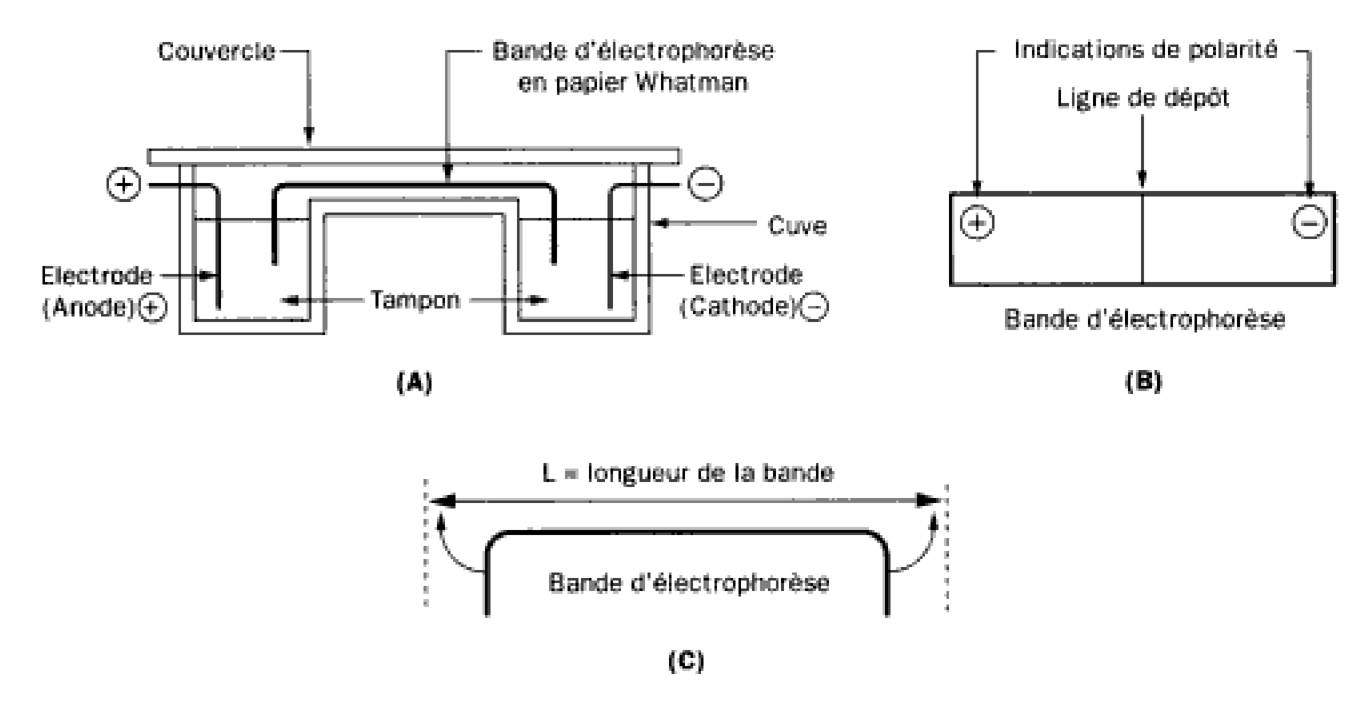


Figure 3.3. Bande et cuve d'électrophorèse sur papier.
(A) La cuve d'électrophorèse.
(B) Schéma de la bande d'électrophorèse.
(C) Détermination de la longueur de la bande.

Tracer la ligne de dépôt au milieu de chacune des bandes et indiquer les polarités au crayon graphite.
Imprégner les bandes dans le tampon, essorer rapidement l'excès de tampon à l'aide de papier Joseph.
Mettre en place les bandes dans la cuve. Sur la première, effectuer un dépôt de filtrat de jus de fruit, sous forme d'un trait fin et régulier de jus déposé à l'aide d'une pipette capillaire. Sur la deuxième, déposer dans les mêmes conditions le mélange témoin d'acides aminés.

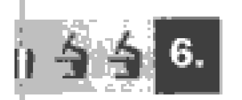
Fermer la cuve à l'aide du couvercle.
Mettre en place les électrodes et relier la cuve au générateur. Régler la tension à 150 V.
Laisser migrer 1 heure.
Arrêter le générateur. Déconnecter la cuve.
Sécher la bande au thermoventilateur (sèche-cheveux). Pulvériser le révélateur à la ninhydrine. Placer à l'étuve à 100 °C.

Résultats, observations et interprétation

Observer et comparer les deux bandes. Interpréter et conclure.

Conclusion

On constate que l'électrophorèse sur papier est une médiocre méthode de fractionnement des acides aminés ; la séparation se fait en trois groupes : les acides aminés neutres, acides et basiques.



6. Séparation électrophorétique des protéines sériques sur bande de gel d'acétate de cellulose

Mots clés

Protéines, sérum, électrophorèse.

Principe

L'électrophorèse a été définie (voir I.3.5) comme une méthode analytique fondée sur la migration différentielle de particules chargées électriquement, sous l'influence d'un champ électrique constant.
Les protéines sériques forment un ensemble hétérogène de macromolécules amphotères. Leur pHi étant toujours inférieur à 9,2, pH du tampon utilisé dans cette expérience, toutes les protéines sont chargées négativement et migreront vers l'anode (pôle +).
La séparation se fera en fractions, ensemble de protéines ayant la même mobilité.

Sécurité

L'utilisation d'un sérum humain est proscrite, celle d'un sérum animal doit être accompagnée de mesures très strictes d'asepsie : pas de pipetage à la bouche, désinfection des récipients et pipettes à l'eau de Javel, désinfection de la paillasse à l'eau de Javel, port de gants en caoutchouc à usage unique.
Le tampon d'électrophorèse est constitué de véronal, de véronal sodique et de Tris. Véronal et véronal sodique sont classés comme stupéfiants dans la classification toxicologique helvétique, le Tris est irritant.
L'acide acétique est irritant, il est placé dans la classe 3 (poison puissant).
L'acide trichloracétique est un acide fort et corrosif, placé dans la classe 2 de la classification toxicologique helvétique.
Le méthanol est un toxique placé dans la classe 3.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

Sérum animal (cheval, porc, lapin) fraîchement préparé.

■ ***Réactifs***

- Tampon véronal Tris, pH 9,2, 0,04 mol/L :
  - véronal sodique 10,3 g
  - véronal acide 1,84 g
  - tris 7,2 g
  - eau distillée qsp 1 000 cm^3
- Fixateur : acide trichloracétique à 30 g/L.
- Colorant : rouge Ponceau S 5 g par litre d'acide trichloracétique à 50 g/L.
- Solution de lavage : acide acétique à 5 %.
- Transparisant (à préparer extemporanément) :
  - méthanol 85 cm^3
  - acide acétique 15 cm^3
  - glycérol 0,5 cm^3

■ ***Matériel***
– Un générateur de courant stabilisé pour électrophorèse.
– Une cuve d'électrophorèse.
– Bandes d'électrophorèse de gel d'acétate de cellulose (Cellogel commercialisé par Sebia).
– Une micropipette de 2 µL ou un applicateur de sérum pour électrophorèse.

Mode opératoire

■ ***Préparation des bandes***
Déposer les bandes sur une feuille de papier Joseph. Au crayon gras marquer la polarité des bandes à leurs extrémités.
Lorsque les bandes présentent une face brillante et une face mate, c'est sur cette dernière que sera effectué le dépôt. Les bandes sont imprégnées de tampon : à cet effet, elles sont disposées à plat sur la surface du tampon qui les imprègne progressivement par capillarité, ce qui permet de ne pas emprisonner de bulles d'air dans l'épaisseur de la bande. Dès qu'elles sont suffisamment imbibées, leur couleur passe au gris léger, on peut alors les immerger à l'aide d'une baguette de verre. Si des bulles sont emprisonnées, elles forment des taches blanches. De telles bandes doivent être éliminées, à moins que les bulles ne soient rares et petites, et disposées en dehors du parcours de la migration. Laisser les bandes immergées pendant au moins 15 minutes. Manipuler les bandes avec précaution en utilisant des pinces.

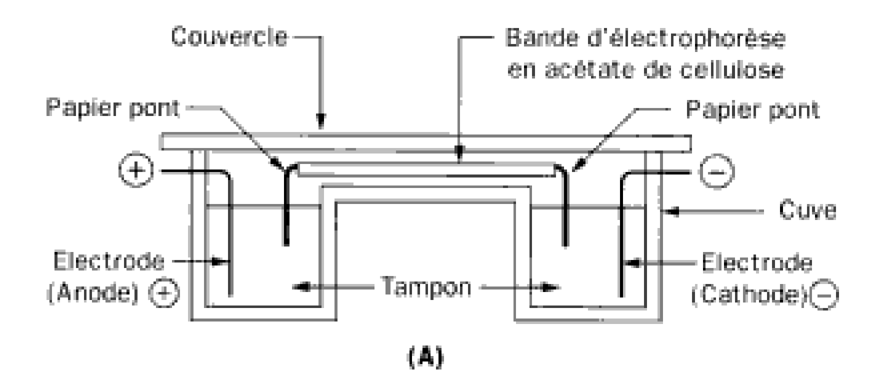
■ ***Mise en place des bandes***
Verser le même volume de tampon dans chacun des compartiments de la cuve. Sortir les bandes du tampon où elles sont immergées. Essorer l'excès de tampon à l'aide de papier Joseph (ne pas sécher exagérément les bandes qui doivent rester imbibées). Mettre en place les bandes en utilisant le papier pont qui assure la continuité électrique *(fig. 3.4A)*.
Les bandes doivent être placées la face mate vers le haut, les repères de polarité du même côté.

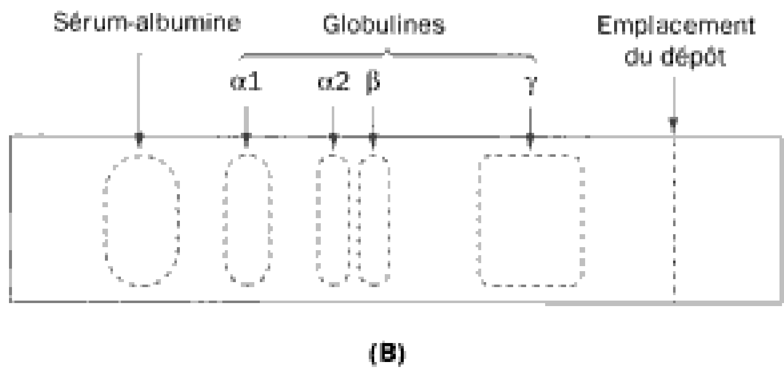
■ ***Dépôt du sérum***
Le dépôt est effectué à 2 cm du côté cathodique et à 4 mm des bords de la bande (pour éviter les effets de bord).
Le dépôt peut être réalisé :
– à l'aide d'une micropipette par un mouvement de va-et-vient régulier (facilité en s'appuyant sur une règle posée en travers de la cuve). Le volume du sérum à déposer est de l'ordre de 2 µL ;
– à l'aide d'un applicateur pour dépôt de sérum.

■ ***Migration***
Connecter la cuve à l'alimentation stabilisée (le dépôt doit se trouver du côté cathodique). Régler la tension à 150 V et laisser migrer durant environ 2 heures.

■ ***Fixation et coloration***
Plonger les bandes pendant 30 secondes dans une solution d'acide trichloracétique à 30 g/L, pour précipiter les protéines, afin qu'elles ne soient pas éluées.
Immerger les bandes pendant 3 à 4 minutes dans la solution de rouge Ponceau S.
Laver l'excès de colorant dans une solution d'acide acétique à 5 %, trois fois de suite dans des bains d'acide renouvelés dès qu'ils sont devenus trop rouges.

■ ***Identification des différentes fractions protéiques***
La *figure 3.4B* schématise la bande d'acétate de cellulose après fixation et coloration. On y distingue aisément la sérum-albumine et les α_1, α_2, β et γ globulines.





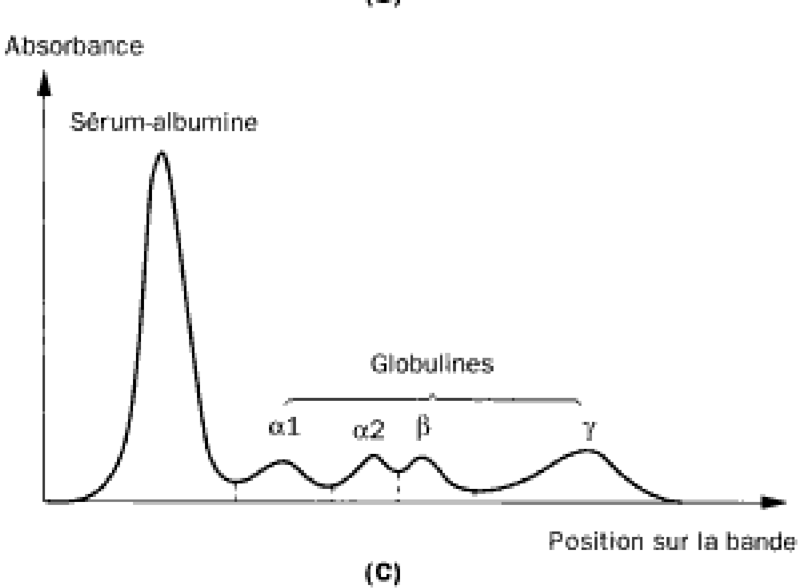


Figure 3.4. Electrophorèse des protéines sériques.
(A) Schéma de la cuve, la bande est mise en place avec du papier pont.
(B) Schéma de la bande après révélation.
(C) Courbe densitométrique de la bande.

■ ***Exploitation quantitative des résultats***

Cette partie de la manipulation nécessite un densitomètre-intégrateur.

Immerger les bandes dans la solution de transparisation pendant 3 à 5 minutes.

Etendre la bande sur une plaque de verre très propre. Eliminer les bulles d'air à l'aide d'un agitateur.

Placer l'ensemble quelques minutes à l'étuve à 60 °C.

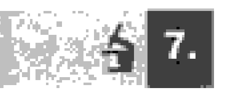
Laisser refroidir la bande.

Résultats, observations et interprétation

Effectuer la lecture dans le densitomètre-intégrateur. On obtient l'électrophorégramme *(fig. 3.4C)* et les pourcentages de chacune des fractions.

Les valeurs usuelles pour un sérum humain normal sont :

– sérum-albumine : 50 à 60 %
– α_1-globulines : 3 à 5 %
– α_2-globulines : 7 à 10 %
– β-globulines : 10 à 14 %
– γ-globulines : 16 à 23 %.



7. Mise en évidence de la présence d'acides aminés dans un jus de fruit et dans un extrait de viande par chromatographie sur couche mince

Mots clés

Acides aminés, chromatographie sur couche mince, ninhydrine.

Principe

Les acides aminés des échantillons sont séparés par chromatographie d'adsorption sur gel de silice. Les spots sont révélés par coloration à la ninhydrine.

Sécurité

Le solvant de chromatographie contient de l'acide acétique et du butanol. L'acide acétique est corrosif et irritant, placé dans la classe 3 de la classification toxicologique helvétique (poison puissant). Le butanol inflammable et nocif est placé dans la classe 4 (matières critiques).
La solution de ninhydrine, relativement toxique (la ninhydrine est placée dans la classe 3 de la classification toxicologique helvétique, poison puissant), doit être pulvérisée sous hotte ventilée.

Matériel et matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***
- Jus d'orange filtré.
- Extrait de bouillon de viande : peser 5 g d'une tablette de bouillon. Faire une extraction avec 20 cm^3 d'eau. Filtrer l'extrait, le décolorer par du noir animal.

■ ***Réactifs***
- Solutions témoins d'acides aminés :
  - solution de proline à 2 g/L,
  - solution d'arginine à 2 g/L,
  - solution de glycine à 2 g/L,
  - solution d'acide glutamique à 2 g/L,
  - solution de valine à 2 g/L,
  - solution de tyrosine à saturation.
- Solution de ninhydrine à 2 g/L dans le butanol. A conserver au réfrigérateur.
- Solvant de chromatographie : butanol-acide acétique-eau (4/2/1 : V/V/V).

■ ***Matériel***
- Cuve de chromatographie pour plaques 5 × 10 cm, équipée de 2 plaques 5 × 10 cm de gel de silice sur support verre (commercialisée par Merck, réf. : 1.15685.0001).

A défaut :
- Pots en verre pour conserves familiales, munies d'un couvercle hermétique, équipée de 2 plaques de gel de silice 5 × 10 cm (commercialisée par Merck).
- Capillaires obtenus par étirement de pipettes Pasteur.
- Thermoventilateur (sèche-cheveux).

Mode opératoire

Réactiver les chromatoplaques en les plaçant à l'étuve à 104 °C pendant 15 minutes.

Verser le solvant dans la cuve sur une hauteur de 1 cm, laisser saturer pendant 30 minutes.

Préparer les plaques. Tracer, très légèrement, la ligne de dépôt à 2 cm du bord inférieur, au crayon graphite. Tracer les emplacements équidistants de 5 dépôts sur chaque plaque.

Effectuer les dépôts, à l'aide de pipettes capillaires (une pipette ne peut être que pour une solution donnée), les taches ne doivent pas dépasser 2 à 3 mm de diamètre. Effectuer le dépôt à 3 reprises successives en séchant au thermoventilateur entre chaque dépôt.

Déposer sur la première plaque : le jus d'orange, le jus de viande, la solution étalon de proline, celle d'arginine et celle de glycine. Déposer sur la seconde plaque : le jus d'orange, le jus de viande, la solution étalon d'acide glutamique, celle de valine et celle de tyrosine.

Introduire les plaques dans la cuve saturée. Fermer la cuve. Laisser migrer jusqu'à 1 cm du haut des plaques.

Sortir les plaques et tracer au crayon le front du solvant. Les sécher au thermoventilateur. Pulvériser le réactif à la ninhydrine sous une hotte ventilée. Placer les plaques à l'étuve à 104 °C pendant quelques minutes. Entourer chaque spot d'un trait crayon.

Résultats, observations et interprétation

Identifier les acides aminés contenus dans les échantillons.



8. Préparation d'une solution d'hémoglobine et étude des propriétés spectrales de l'oxyhémoglobine et de la désoxyhémoglobine

Cette expérience peut être faite à deux niveaux, le premier, très simple, ne nécessite que très peu de matériel, le second, plus sophistiqué, nécessite un appareillage de laboratoire relativement complexe.

Mots clés

Désoxyhémoglobine, oxyhémoglobine, couleurs, spectres d'absorption.

Principe

L'hémoglobine ou, plutôt, les hémoglobines (il existe en effet plusieurs variétés d'hémoglobines selon les espèces animales, selon l'âge et selon divers états pathologiques), sont des chromoprotéines qui assurent le transport de l'oxygène en s'y fixant réversiblement.

$$\underset{\text{Désoxyhémoglobine}}{Hb + 4\,O_2} \rightleftarrows \underset{\text{Oxyhémoglobine}}{Hb\,(O_2)_4}$$

L'hémoglobine est formée d'une fraction protéique appelée globine et de groupements prosthétiques appelés hème.

Les globines des hémoglobines sanguines sont des tétramères résultant de l'assemblage spécifique et symétrique de quatre chaînes peptidiques.

Ainsi la globine de l'hémoglobine humaine A (adulte) est constituée de 2 chaînes α et de 2 chaînes β.

Chacune des chaînes est liée à un hème ou ferro-protoporphyrine IX *(fig. 3.5A)*, il y a donc 4 atomes de fer par molécule d'hémoglobine.

La liaison globine-hème a été bien étudiée dans la myoglobine de cachalot (hémoglobine musculaire ne comportant qu'une seule chaîne) *(fig. 3.5B)*.

L'hème est lié à la globine par une liaison de coordination entre l'azote du résidu histidyl 93 et une autre liaison de coordination indirecte avec le résidu histidyl 64, par l'intermédiaire d'une molécule d'eau *(fig. 3.5B)*.

La formation d'oxyhémoglobine correspond à une oxygénation de l'hémoglobine sur la sixième coordination du fer. Ce n'est pas une oxydation, le fer demeurant à l'état ferreux *(fig. 3.5D)*.

La désoxyhémoglobine est de couleur rouge sombre *(fig. 3.5C)*, l'oxyhémoglobine est rouge vif.

Sécurité

C'est une expérience qui ne présente pas de danger réel. Un certain nombre de précautions sont cependant à prendre concernant la manipulation du sang animal :

– utilisation de gants en caoutchouc à usage unique ;
– désinfection des récipients et des pipettes à l'eau de Javel ;
– désinfection de la paillasse à l'eau de Javel.

Il est recommandé de travailler avec des ampoules de sang stérile de cheval, commercialisé par l'institut Pasteur.

Par ailleurs, l'hydrosulfite de sodium (dithionite de sodium) est un composé nocif, il appartient à la classe 3 de la classification toxicologique helvétique (poison puissant), utilisé à la spatule. Il faut éviter tout contact avec les yeux et les muqueuses.

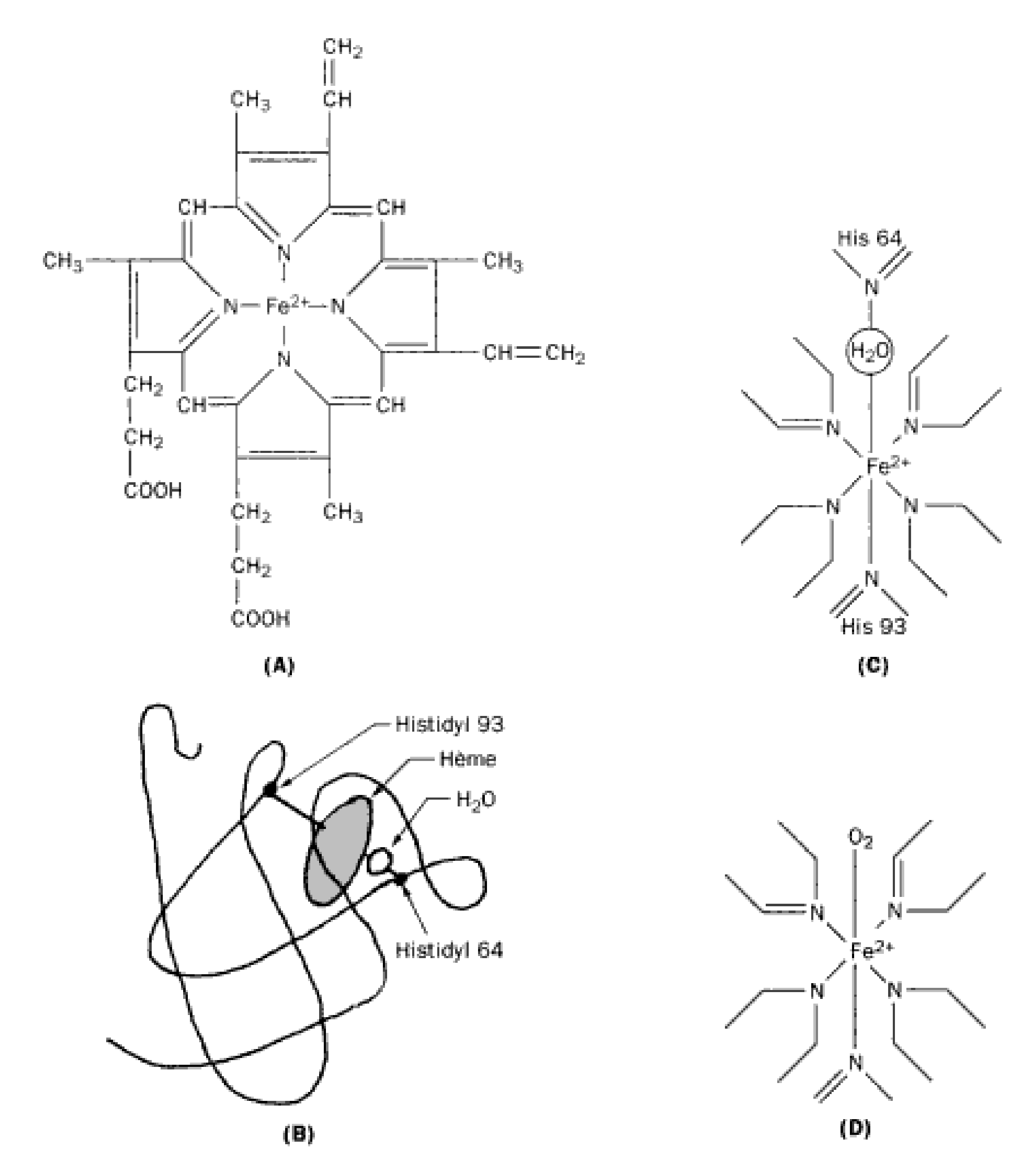


Figure 3.5. Structure de l'hème et liaison hème-globine.
(A) Structure de l'hème.
(B) La liaison hème-globine dans la myoglobine de cachalot.
(C) Le complexe fer-porphyrine dans la désoxymyoglobine.
(D) Le complexe fer-porphyrine dans l'oxymyoglobine.

Matière d'œuvre concernant l'expérience de premier niveau

■ ***Matériel biologique***

0,5 cm^3 de sang animal (cheval, porc, lapin), recueilli sur anticoagulant en abattoir, ou mieux du sang stérile de cheval en ampoule commercialisé par l'institut Pasteur.

■ ***Réactifs***

De l'hydrosulfite de sodium (dithionite de sodium) cristallisé.

■ ***Matériel***
– Deux tubes à essais.
– Une spatule.

Matière d'œuvre concernant l'expérience de second niveau

■ ***Matériel biologique***
5 cm^3 de sang animal (cheval, porc, lapin), recueilli sur anticoagulant, ou mieux du sang stérile de cheval en ampoule commercialisé par l'institut Pasteur.

■ ***Réactifs***
– De l'eau physiologique (solution de NaCl à 9 g/L).
– De l'hydrosulfite de sodium (dithionite de sodium) cristallisé.

■ ***Matériel***
– Une centrifugeuse équipée.
– Un spectrophotomètre visible à double faisceau avec enregistreur ou à défaut un spectrophotomètre visible monofaisceau.
– Des cuves pour spectrophotomètre.
– Une pipette graduée de 1 cm^3.
– Une poire d'aspiration.
– Une éprouvette graduée de 20 cm^3.

Mode opératoire de l'expérience de premier niveau

Dans un tube à essais, introduire 0,5 cm^3 de sang animal, ajouter 15 cm^3 d'eau distillée. Agiter, il y a hémolyse ; remarquer que le sang prend une couleur rouge vif, l'hémoglobine est sous forme d'oxyhémoglobine.
Partager le sang dans 2 tubes à essais. Introduire dans le second tube une très petite pointe de spatule de dithionite de sodium, agiter. Le contenu du second tube prend une couleur rouge sombre. L'hémoglobine est sous forme de désoxyhémoglobine.
Comparer les teintes des 2 tubes.
Le dithionite de sodium est un réducteur puissant qui a désoxygéné le milieu.

Mode opératoire de l'expérience de second niveau

■ ***Préparation de la solution d'hémoglobine***
Verser 5 cm^3 de sang animal dans un tube à centrifuger. Ajouter 15 cm^3 d'eau physiologique, homogénéiser soigneusement. Centrifuger 5 minutes à 3 000 RPM (Rotations Par Minute). Jeter le surnageant. Répéter ce lavage 2 fois.
Ajouter au dernier culot 15 cm^3 d'eau distillée. Agiter fortement pour provoquer une lyse complète des cellules.
Centrifuger 5 minutes à 5 000 RPM. Recueillir le surnageant en éliminant le culot contenant les stromas cellulaires.
Cette solution représente la solution-mère d'hémoglobine.

■ ***Préparation de la solution-fille d'hémoglobine***
Mesurer l'absorbance de cette solution à 578 nm, contre de l'eau distillée. La diluer de façon à obtenir une absorbance à 578 nm de l'ordre de 1. La solution diluée est la solution-fille sur laquelle on va tracer les spectres.

■ ***Tracé des spectres***
Si l'on dispose d'un spectrophotomètre double faisceau avec enregistreur, placer une cuve contenant de l'eau distillée dans le faisceau de référence et une cuve contenant la solution-fille dans le faisceau de mesure.

Si l'on ne dispose que d'un spectrophotomètre monofaisceau, faire des mesures point par point tous les 10 nm en réglant à chaque fois le zéro optique sur de l'eau distillée.

Tracer un spectre de la solution-fille en balayant le domaine spectral de 620 à 480 nm.

On obtient une courbe présentant deux pics, l'un à 540 nm, l'autre à 578 nm : cette courbe est caractéristique de l'oxyhémoglobine *(fig. 3.6)*.

Dans la cuve spectrophotométrique contenant la solution-fille, ajouter une pointe de spatule de dithionite de sodium. Agiter par retournement sur parafilm. Observer un changement de teinte. Tracer le spectre de cette nouvelle solution en balayant le domaine spectral de 620 à 480 nm.

On obtient une courbe présentant un maximum d'absorption à 554 nm (qui s'appelle la bande de Stokes), caractéristique de la désoxyhémoglobine *(fig. 3.6)*.

Superposer les deux courbes.

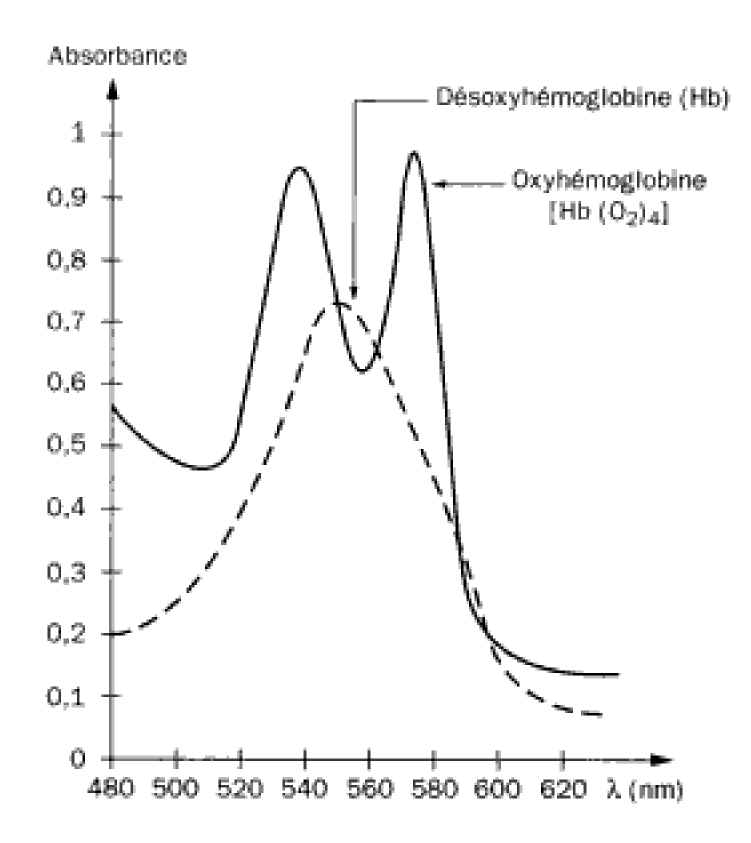


Figure 3.6. Spectres d'absorption de l'oxyhémoglobine et de la désoxyhémoglobine.



9. Hydrolyse de l'urée par l'uréase

Mots clés

Urée, uréase, hydrolyse enzymatique.

Principe

L'urée est la forme d'excrétion de l'azote aminé des animaux uréotèles (mammifères, sélaciens, amphibiens). Fabriquée dans le foie, l'urée est excrétée par voie urinaire, où cette molécule représente 80 % de l'azote total urinaire.
L'urémie normale, chez l'homme, est de 0,4 g/L, la quantité excrétée est de 20 à 30 g par jour.
L'urine émise, l'urée est dégradée par hydrolyse sous l'effet d'une enzyme de microbes du sol (bactéries ou champignons) en CO_2 et NH_3.

$$CO(NH_2)_2 + 2\ H_2O \xrightarrow{\text{Uréase}} CO_3^{2-} + 2\ NH_4^+$$

La présence de l'urée est caractérisée par la réaction à la diacétylmonoxine qui donne une coloration jaune en milieu sulfurique et à chaud, suivie d'une oxydation par la chloramine T.

Sécurité

La diacétylmonoxine est un composé placé dans la classe 4 de la classification toxicologique helvétique (matière critique).
L'acide sulfurique est un produit corrosif placé dans la classe 1 (poison très puissant) ; cet acide est à manipuler en portant des lunettes de protection et une blouse de coton fermée. La chloramine T est un composé irritant placé dans la classe 4.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***
Suspension d'uréase à 5 mg/cm^3 dans du tampon phosphate pH 6,1 (voir I.3.5).

■ ***Réactifs***
- Solution d'urée à 0,8 g/L.
- Solution de diacétylmonoxine à 30 g/L.
- Solution-mère de chloramine T à 5 g/L. La solution-mère est à préparer peu de temps avant l'emploi. La solution de travail est préparée extemporanément par dilution au 1/10 de la solution-mère.

■ ***Matériel***
- Tubes à essais.
- Trois pipettes de 1 cm^3.
- Deux pipettes graduées de 5 cm^3.
- Une éprouvette de 10 cm^3.
- Une pipette de 10 cm^3.
- Une poire d'aspiration.
- Un bain thermostaté à 37 °C ou un grand cristallisoir contenant de l'eau à 37 °C.
- Une fiole erlenmeyer de 50 cm^3.
- Un becher de 250 cm^3 qui servira de bain-marie bouillant.

Mode opératoire

Dans une fiole erlenmeyer de 50 cm^3, verser :
– 5 cm^3 de solution d'urée à 0,8 g/L ;
– 10 cm^3 de suspension d'uréase tamponnée à pH 6,1.
Placer au bain thermostaté pendant 20 minutes à 37 °C.
Pendant ce temps, caractériser l'urée dans la solution de substrat.
Diluer la solution d'urée de la manière suivante :
– 5 cm^3 de solution d'urée à 0,8 g/L ;
– 10 cm^3 d'eau distillée.
Dans un tube à essais, introduire :
– 2 cm^3 de la solution diluée d'urée ;
– 1 cm^3 de solution de diacétylmonoxine ;
– 2 cm^3 d'acide sulfurique concentré.
Porter 10 minutes au bain-marie bouillant. Dès la sortie du bain-marie, ajouter dans chaque tube 1 cm^3 de solution de chloramine T à 5 g/L, diluée 10 fois. Mélanger.
Une coloration jaune caractérise la présence d'urée.
Après les 20 minutes d'hydrolyse enzymatique de l'urée, répéter la réaction de caractérisation en opérant sur 2 cm^3 de milieu réactionnel.

Résultats, observations et interprétation

L'absence de coloration jaune indique la disparition de l'urée.



Les grains d'aleurone dans les graines des Végétaux supérieurs

Mots clés

Aleurone, cristalloïde, globoïde.

Principe

Toute cellule vivante réalise la synthèse de protéines nécessaires à sa constitution et à son métabolisme ; les protéines ne sont-elles pas les molécules de la vie !
Mais, par suite de leur utilisation ou de leur *turn-over,* on ne trouve guère de protéines accumulées chez les Végétaux supérieurs.
Un cas particulier existe cependant : leur accumulation sous forme de réserves protéiques dans les graines, organes de résistance et de dissémination des Angiospermes, par exemple.
Au moment de la formation de la graine dans l'ovaire devenant fruit, la construction de l'albumen débute en même temps que celle de la plantule. Cet albumen est formé de jeunes cellules embryonnaires à petites vacuoles dispersées dans le cytoplasme. Dans ces vacuoles s'accumulent des substances solubles dans l'eau ou simplement miscibles avec elle.
Les contenus vacuolaires ainsi concentrés, la graine poursuit sa maturation en étant l'objet d'une forte déshydratation : chacune des vacuoles perd de l'eau, son contenu devient « solide » avec les substances accumulées au préalable. Les vacuoles se transforment ainsi en autant de « vacuoles solides » ou grains d'aleurone.

Sécurité

Cette manipulation ne présente aucun danger.

Matière d'œuvre

Matériel biologique

Graine de Ricin ayant séjourné 24 heures dans l'eau.

Réactifs

– Huile de Ricin.
– Solution iodo-iodurée (voir I.2.1).

Matériel

– Microscope.
– Lames et lamelles.
– Lame de rasoir.
– Aiguille lancéolée.
– Scalpel.

Mode opératoire

Envisageons le cas de la graine de Ricin.
Décortiquer puis couper une graine de Ricin. Pratiquer quelques coupes fines dans l'albumen de la graine albuminée du Ricin.
Les grains d'aleurone sont difficiles à observer en place car ils ont la même taille que les gouttelettes huileuses caractéristiques du Ricin. Les grains d'aleurone apparaissent ternes tandis que les gouttelettes d'huile sont très réfringentes.

Pour une étude convenable, il convient de monter les coupes fines réalisées dans une goutte d'huile de Ricin pour réaliser un fond réfringent homogène, favorable à l'observation microscopique.

Résultats, observations et interprétation

L'aleurone, substance de réserve protéique, existe d'abord à l'état dissous dans des vacuoles qui se déshydratent au cours de la maturation de la graine.

La nature vacuolaire des grains d'aleurone est démontrée d'abord par l'étude de leur formation dans les graines en maturation et ensuite par l'observation de leur comportement à l'occasion de la germination.

Dans les jeunes graines, non encore déshydratées, le tissu parenchymateux de réserve possède des cellules à grandes vacuoles liquides.

Pendant la maturation des semences, la déshydratation des cellules s'exprime par un découpage des vacuoles en éléments plus petits et plus nombreux ; conjointement, le cytoplasme y accumule des réserves protéiques.

A terme, le contenu de ces petites vacuoles se solidifie et constitue les grains d'aleurone.

La taille et l'organisation des grains d'aleurone varient d'une espèce végétale à l'autre, mais ces éléments sont constants et caractéristiques d'un végétal donné.

Dans le cas de l'albumen du Ricin, les grains d'aleurone sont nombreux, ovoïdes, déformés *(fig. 3.7)* souvent par la présence de un ou de deux « globoïdes » qui forment leur

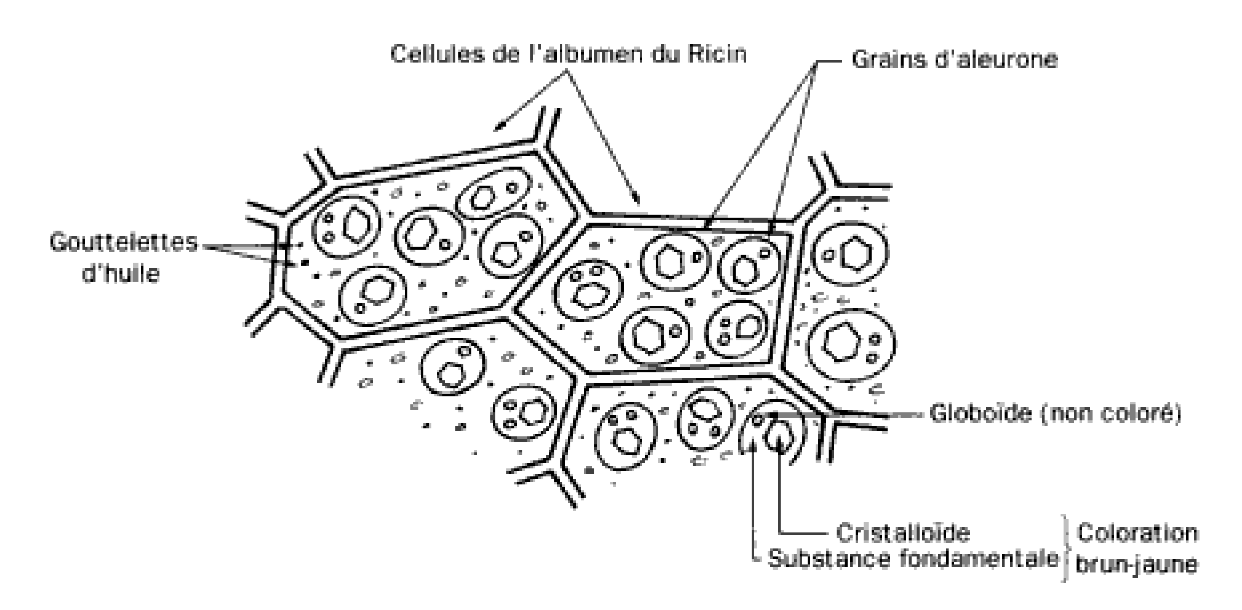


Figure 3.7. Les grains d'aleurone dans la graine.

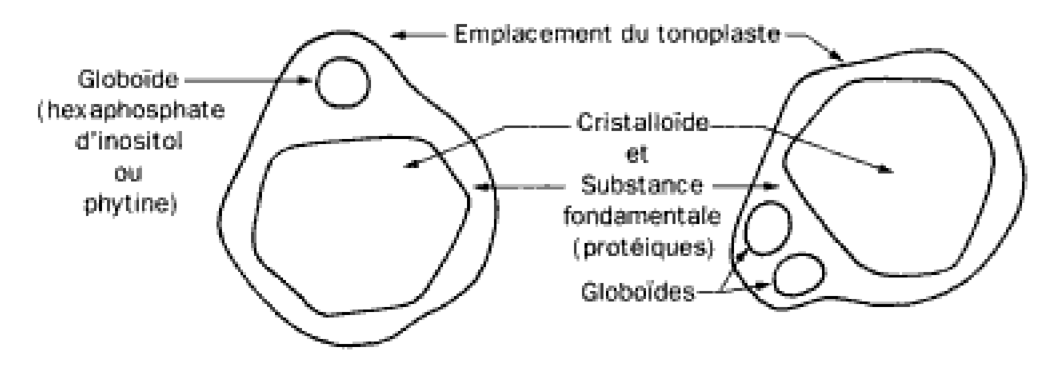


Figure 3.8. Organisation de l'aleurone chez le Ricin.

partie minérale (constituée de phytine ou hexaphosphate d'inositol avec Ca^{2+} et Mg^{2+}). Le reste est leur partie organique, à base de réserves protéiques azotées.
Explorer la préparation, ses bords essentiellement. Repérer à un fort grossissement un grain d'aleurone et le dessiner avec son ou ses globoïdes *(fig. 3.8)*.
Avant de représenter en schéma la partie organique, ajouter une goutte d'une solution d'iode. Laisser pénétrer lentement par capillarité : voir apparaître, en marron, l'essentiel de la partie protéique :
- celle pratiquement anhydre au pourtour anguleux : le cristalloïde (de nature colloïdale) ;
- autour du cristalloïde, le reste du grain d'aleurone ou substance fondamentale, zone protéique moins déshydratée, conférant à l'ensemble la forme arrondie caractéristique.

Conclusion

Les grains d'aleurone sont présents dans toutes les graines où ils accompagnent les grains d'amidon (graines amylacées) ou les enclaves huileuses (graines oléagineuses).
Les grains d'aleurone sont des vacuoles déshydratées qui, au cours de la germination ultérieure, absorbent de l'eau et redeviennent des vacuoles normales.
En effet, lorsque la semence germe, la forte hydratation de ses cellules entraîne l'imbibition de leurs constituants : les vacuoles retrouvent ainsi leur aspect fluide.
En même temps que l'activité métabolique augmente, des protéases mobilisent les réserves protéiques des grains d'aleurone en acides aminés, directement utilisables en vue de la croissance du jeune végétal.
Autrement dit, l'appareil vacuolaire subit, pendant la germination, une évolution inverse de celle qu'il a présentée lors de la maturation de la semence.

$$\text{vacuoles} \underset{\text{germination de la graine}}{\overset{\text{maturation de la graine}}{\rightleftarrows}} \text{grains d'aleurone}$$



Les constituants lipidiques de la matière vivante

Sommaire

Page



1. Hydrolyse des triglycérides de l'huile d'olive par la lipase pancréatique

1.1. Expérience d'utilisation de la lipase pancréatique *in situ*

Mots clés

Lipides, huile d'olive, lipase, hydrolyse enzymatique.

Principe

La lipase pancréatique catalyse l'hydrolyse des triglycérides puis, avec une activité moindre, des di et monoglycérides. Elle a une spécificité pour les triglycérides constitués d'acides gras à longue chaîne (C16 à C18). Cette enzyme attaque préférentiellement la liaison ester en C1 du glycérol.

Sécurité

Ne pipeter aucune des solutions à la bouche.
La solution de soude (hydroxyde de sodium) 0,01 mol/L est relativement peu corrosive, placée dans la classe 4 (substance critique). Il faut cependant éviter tout contact avec les yeux ou les muqueuses.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***
- Huile d'olive neutre.
- Un morceau de pancréas de porc fraîchement prélevé dans un abattoir et conservé dans la glace, ou de lapin ou de rat.

■ ***Réactifs***
- Solution de bleu de bromothymol à 0,2 g/L d'alcool à 50 volumes.
- Solution de soude (hydroxyde de sodium) 0,01 mol/L.
- Une étuve à 38 °C.

■ ***Matériel***
- Filtre rond sans cendre de 70 mm de diamètre (commercialisé par Prolabo).
- Boîte de Pétri à usage unique en plastique.
- Pinces brucelles.
- Scalpel.
- Ciseaux.

Mode opératoire

Amener la solution de bleu de bromothymol à la couleur bleue (pH = 7,6), par addition de une ou plusieurs gouttes de solution 0,01 mol/L d'hydroxyde de sodium.
Imprégner un filtre rond (diamètre 70 mm) de cette solution. Laisser sécher.
Immerger le filtre dans de l'huile d'olive neutre. Laisser égoutter, puis disposer le filtre au fond de la boîte de Pétri.
Placer au centre de la boîte, sur le papier filtre imbibé, un petit morceau de pancréas frais. Couvrir la boîte pour éviter la dessiccation. Placer à l'étuve à 38 °C pendant 2 heures.

Résultats, observations et interprétation

Observer une coloration jaune autour du fragment de pancréas.
Cette acidification caractérise l'apparition d'acides gras issus de l'hydrolyse des triglycérides de l'huile d'olive.

1.2. Expérience d'utilisation de la lipase pancréatique *in vitro*

Mots clés

Lipides, huile d'olive, lipase, hydrolyse enzymatique.

Principe

Le constituant majeur de l'huile d'olive est le trioléate de glycéryle ; la lipase pancréatique catalyse la réaction d'hydrolyse des triglycérides, en glycérol et acides gras *(fig. 4.1)*.

$$\begin{array}{l} CH_2-O-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_7-CH_3 \\ CH-O-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_7-CH_3 \\ CH_2-O-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_7-CH_3 \end{array} + H_2O \xrightarrow[\text{pancréatique}]{\text{Lipase}} \begin{array}{l} CH_2-OH \\ CH-O-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_7-CH_3 \\ CH_2-O-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_7-CH_3 \\ + \\ CH_3-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_7-COOH \end{array}$$

$$\begin{array}{l} CH_2-OH \\ CH-O-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_7-CH_3 \\ CH_2-O-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_7-CH_3 \end{array} + 2H_2O \xrightarrow[\text{pancréatique}]{\text{Lipase}} \begin{array}{l} CH_2-OH \\ CHOH \\ CH_2-OH \\ + \\ 2\ CH_3-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_7-COOH \end{array}$$

Figure 4.1. Hydrolyse enzymatique du trioléate de glycéryle.

Sécurité

Ne pipeter aucune des solutions à la bouche.
La solution de soude (hydroxyde de sodium) 0,1 mol/L est corrosive, placée dans la classe 3 (poison puissant). Il faut éviter tout contact avec les yeux ou les muqueuses.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***
- Huile d'olive.
- Solution de pancréatine à 1 g pour 100 cm^3 d'eau distillée. Ajuster le pH à 7 en présence d'une goutte de bleu de bromothymol (obtention d'une teinte verte).

■ ***Réactifs***
- Solution de bleu de bromothymol à 0,2 g/L d'alcool à 50 volumes.
- Solution de tauroglycocholate de sodium (réf. Merck : 112354) à 50 g/L.
- Solution de soude (hydroxyde de sodium) 0,1 mol/L.

Matériel
– Deux pipettes de 1 cm^3.
– Une pipette graduée de 5 cm^3.
– Une poire d'aspiration.
– Une éprouvette de 10 cm^3.
– Une pipette compte-gouttes.
– Deux tubes à essais.
– Un portoir métallique pour tubes à essais.
– Un bain thermostaté réglé à 38 °C.

Mode opératoire

Dans une tube à essais, introduire :
– 2 cm^3 d'huile d'olive ;
– 2 cm^3 de solution de tauroglycocholate de sodium ;
– 10 cm^3 d'eau distillée, agiter pour émulsionner.
– Ajouter 3 gouttes de solution de bleu de bromothymol et alcaliniser par de la solution de soude 0,1 mol/L, versée goutte à goutte, jusqu'à obtenir le virage de la teinte au bleu (ne pas ajouter un excès de soude, sinon la réaction enzymatique ne se produirait pas).
– Ajouter 3 cm^3 de solution neutre de pancréatine.

Faire un tube témoin de même composition mais en remplaçant la solution de pancréatine par 3 cm^3 d'eau distillée.
Incuber les deux tubes pendant 30 minutes au bain thermostaté à 38 °C.
Le tube essai a viré au jaune, ce qui indique que le pH est inférieur à 6. L'acidification est la conséquence de la libération d'acides gras par hydrolyse des lipides.

1.3. Analyse chromatographique des produits de la réaction d'hydrolyse

Mots clés

Chromatographie sur couche mince, lipides, chromatographie à deux solvants.

Principe

La séparation des lipides peut être faite par chromatographie sur couche mince de gel de silice.
L'extrait lipidique est déposé à la base de la chromatoplaque, sous forme d'un petit segment.
On utilise deux systèmes de solvants :
– la première migration utilise un solvant des phospholipides : trichloro 1.1.1. éthane/méthanol/eau (65/35/4 : V/V) ;
– la seconde migration utilise un solvant des lipides neutres : éther de pétrole (benzine de pétrole)/éther/acide acétique (80/20/2 : V/V).

La révélation est réalisée par l'iode en vapeur et par la ninhydrine pour les phosphoaminolipides *(fig. 4.2)*.

Sécurité

Le premier solvant de la chromatographie contient du trichloro 1.1.1. éthane, composé peu dangereux placé dans la classe 5 de la classification toxicologique helvétique, et du

méthanol, facilement inflammable et toxique (placé dans la classe 3, poison puissant).
Le second solvant est constitué d'éther de pétrole (benzine de pétrole), composé très inflammable *qui ne peut être utilisé que dans un local sans flamme ni étincelle électrique* (classe 4), d'éther diéthylique également très inflammable, même recommandation d'utilisation (classe 4), et d'acide acétique, corrosif, placé dans la classe 3 (poison puissant).
La solution de ninhydrine, relativement toxique puisque ce réactif est placé dans la classe 3 de la classification toxicologique helvétique (poison puissant), doit être pulvérisée sous hotte ventilée.
Les vapeurs d'iode sont nocives, l'iode figure dans la classe 2 (poison très puissant), la cuve à iode doit être placée dans une hotte ventilée lors de son ouverture.

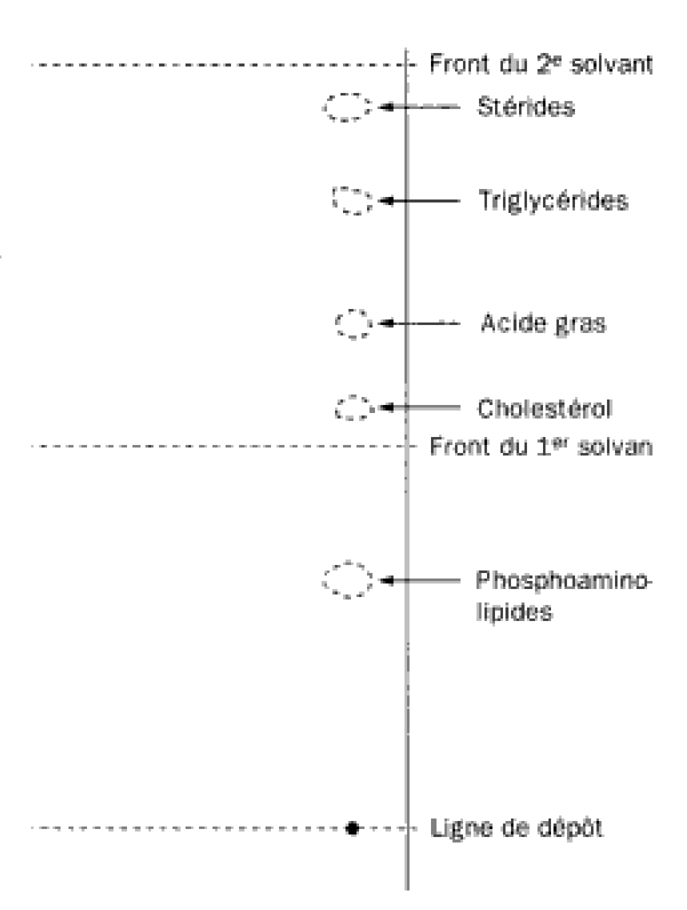


Figure 4.2. Schéma de la chromatographie des lipides à 2 solvants, après révélation.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***
- Acide oléique.
- Trioléate de glycéryle.
- Cholestérol.
- Huile d'olive.
- Lécithine.

■ ***Réactifs***
- Premier solvant (solvant des phospholipides) : trichloro 1.1.1. éthane/méthanol/eau (65/35/4 : V/V).
- Deuxième solvant : éther de pétrole (benzine de pétrole)/éther/acide acétique (80/20/2 : V/V). A étiqueter : inflammable.
- Solutions témoins à 5 g dans 100 cm^3 de mélange trichloro 1.1.1. éthane/méthanol (50/50 : V/V), de cholestérol, d'acide oléique, de trioléate de glycéryle et de lécithine.
- Solution de ninhydrine à 2 g/L dans le butanol. A conserver au réfrigérateur en flacon brun.

■ ***Matériel***
- Une cuve pour chromatographie, utilisant des plaques 10 x 20 cm, à défaut un bocal pour conserves familiales avec couvercle étanche capable de recevoir une plaque 10 × 20 cm (en cas d'impossibilité une plaque 5 × 20 cm).
- Une chromatoplaque de gel de silice sur support en verre (commercialisée par Merck).
- Des pipettes capillaires obtenues par étirage de cannes de verre (une pipette ne peut être utilisée que pour une solution).
- Un thermoventilateur (sèche-cheveux).
- Une cuve à iode : cuve étanche contenant des paillettes d'iode que l'on laisse sublimer jusqu'à saturation de l'atmosphère en vapeurs d'iode (à préparer 24 heures à l'avance).

Mode opératoire

Introduire, sur une hauteur de 1 cm, le premier solvant dans la cuve. Laisser saturer l'atmosphère en vapeurs de solvants pendant une vingtaine de minutes.

Réactiver la chromatoplaque 10 × 20 cm, en la plaçant 10 minutes à l'étuve à 104 °C.

Tracer la ligne de dépôt à 2 cm du bas de la chromatoplaque, au crayon graphite, sous forme d'un trait léger.

A l'aide d'un capillaire, effectuer les dépôts sous forme d'un segment de 0,5 cm de long, pour chaque échantillon ou témoin. Les dépôts sont pratiqués en appliquant 3 fois de suite une microgoutte, le trait du segment ne doit pas avoir plus de 3 mm d'épaisseur. Sécher au thermoventilateur entre chaque dépôt.

Déposer :

- un témoin d'acide oléique ;
- un témoin de trioléate de glycéryle ;
- un témoin de cholestérol ;
- un témoin de lécithine ;
- un échantillon :
  - milieu réactionnel en fin d'hydrolyse (expérience d'hydrolyse enzymatique de l'huile d'olive) ;
  - solution de lécithine préparée à 0,1 g pour 5 cm^3 de trichloro 1.1.1. éthane (expérience de préparation de la lécithine du jaune d'œuf).

Placer la chromatoplaque dans la cuve de chromatographie. Laisser migrer le premier solvant jusqu'à mi-hauteur. Sortir la plaque. Tracer au crayon graphite le front du premier solvant, puis sécher au thermoventilateur.

Pendant ce temps, changer de solvant dans la cuve. Puis, faire migrer le deuxième solvant jusqu'en haut de la plaque.

Marquer le front du deuxième solvant. Sécher au thermoventilateur.

Résultats, observations et interprétation

- Révélation des phosphoaminolipides : pulvériser le réactif à la ninhydrine, placer à l'étuve pendant 3 minutes. Entourer les spots.
- Révélation des lipides neutres : placer la chromatoplaque dans une cuve à vapeur d'iode. Laisser séjourner la plaque pendant 5 minutes, puis la sortir et entourer rapidement les spots car la coloration est fugace.

Il est possible de faire les deux révélations sur une même plaque à condition de révéler à la ninhydrine en premier.

Conclure et interpréter.



2. Détermination de l'indice d'acide et de l'indice d'iode d'un acide gras

Mots clés

Acide gras, indices d'acide et d'iode, masse molaire et degré d'insaturation de l'acide gras.

Principe

• *L'indice d'acide* (I_A) d'un corps gras est la quantité de potasse (mg) nécessaire pour neutraliser l'acidité contenue dans 1 gramme de corps gras.

$$R\text{-}COOH + OH^- \rightarrow RCOO^- + H_2O$$

Cet indice peut être déterminé par dosage direct ou indirect, à l'aide de potasse alcoolique, le corps gras étant en solution dans un solvant organique.
Lors du dosage indirect, le corps gras est dissous dans un excès de potasse alcoolique, l'excès est dosé par une solution d'acide chlorhydrique de concentration connue, en présence de phénolphtaléine *(fig. 4.3)*.

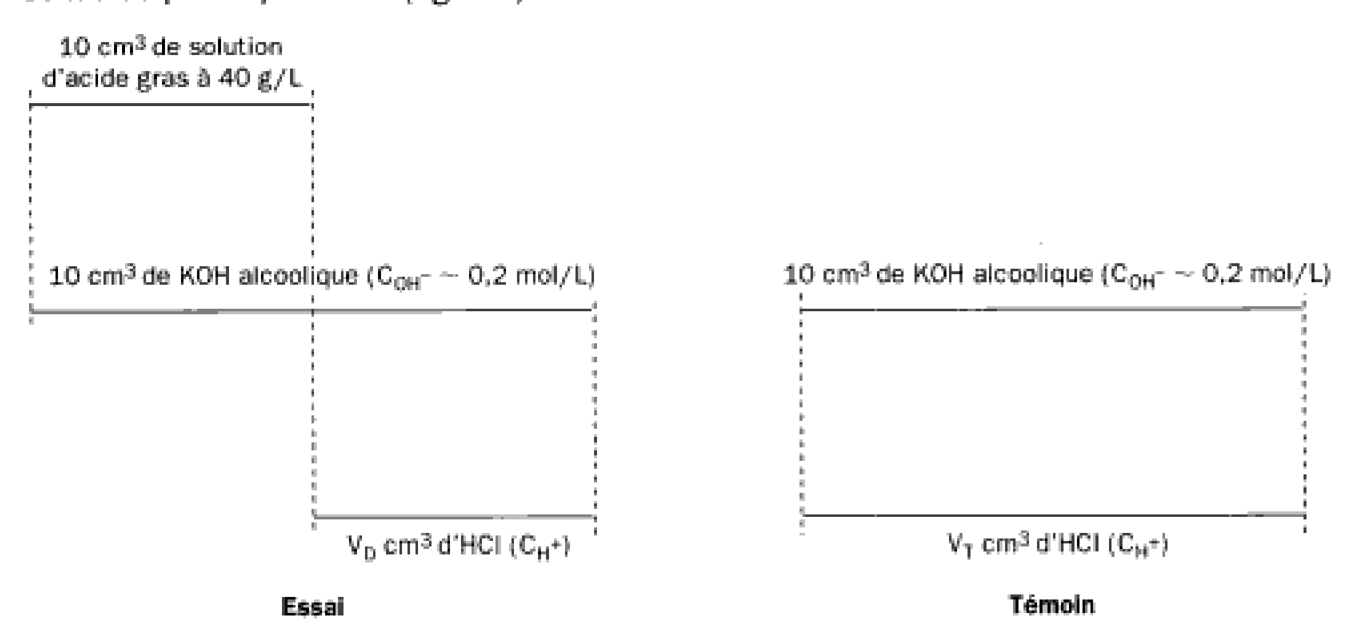


Figure 4.3. Schéma du dosage indirect de l'indice d'acide d'un corps gras.

• *L'indice de saponification* (I_S) d'un corps gras est la quantité de potasse (mg) nécessaire pour neutraliser les acides gras libres et pour saponifier les acides gras combinés présents dans 1 gramme de ce corps gras *(fig. 4.4)*.

$$\begin{array}{l} CH_2-O-CO-R_1 \\ CH-O-CO-R_2 \\ CH_2-O-CO-R_3 \end{array} + 3\,KOH \longrightarrow \begin{array}{l} CH_2-OH \\ CH-OH \\ CH_2-OH \end{array} + \begin{array}{l} R_1-COO^-K^+ \\ R_2-COO^-K^+ \\ R_3-COO^-K^+ \end{array}$$

Glycérol — Savons

Figure 4.4. Réaction de saponification d'un triglycéride.

La saponification se fait à chaud (ébullition à reflux) en présence d'un excès connu de potasse alcoolique. La potasse neutralise les acides gras libres et saponifie les acides gras estérifiés en donnant des savons.
En dosant par de l'acide chlorhydrique titré la potasse en excès n'ayant pas réagi, on peut en déduire la quantité de potasse ayant réagi et en déduire l'indice de saponification.
• *L'indice d'ester* (I_E) d'un corps gras est la quantité de potasse (mg) nécessaire pour saponifier les acides gras combinés contenus dans 1 gramme de corps gras.

$$I_E = I_S - I_A$$

• *L'indice d'iode* d'un corps gras est la masse d'iode (g) que l'on peut fixer sur 100 grammes de corps gras. L'indice d'iode mesure l'insaturation du corps gras, l'iode se fixant sur les doubles liaisons des acides gras.

$$R - CH = CH - R' + I_2 \rightarrow R - CHI = CHI - R'$$

L'iode se fixant lentement et de façon incomplète sur les doubles liaisons, on utilise de préférence des dérivés halogénés de l'iode : le monobromure d'iode ou le monochlorure d'iode.
Dans la méthode de Wijs, le monochlorure d'iode ICl en excès se fixe sur les doubles liaisons selon la réaction :

$$R - CH = CH - R' + ICl \rightarrow R - CHI = CHCl - R'$$

L'excès de ICl réagit ensuite avec de l'iodure de potassium (KI) pour former de l'iode :

$$ICl_{(excès)} + I^- \rightarrow I_2 + Cl^-$$

L'iode formé est dosé par du thiosulfate étalonné *(fig. 4.5)* :

$$I_2 + 2\ S_2O_3^{2-} \rightarrow 2I^- + S_4O_6^{2-}$$

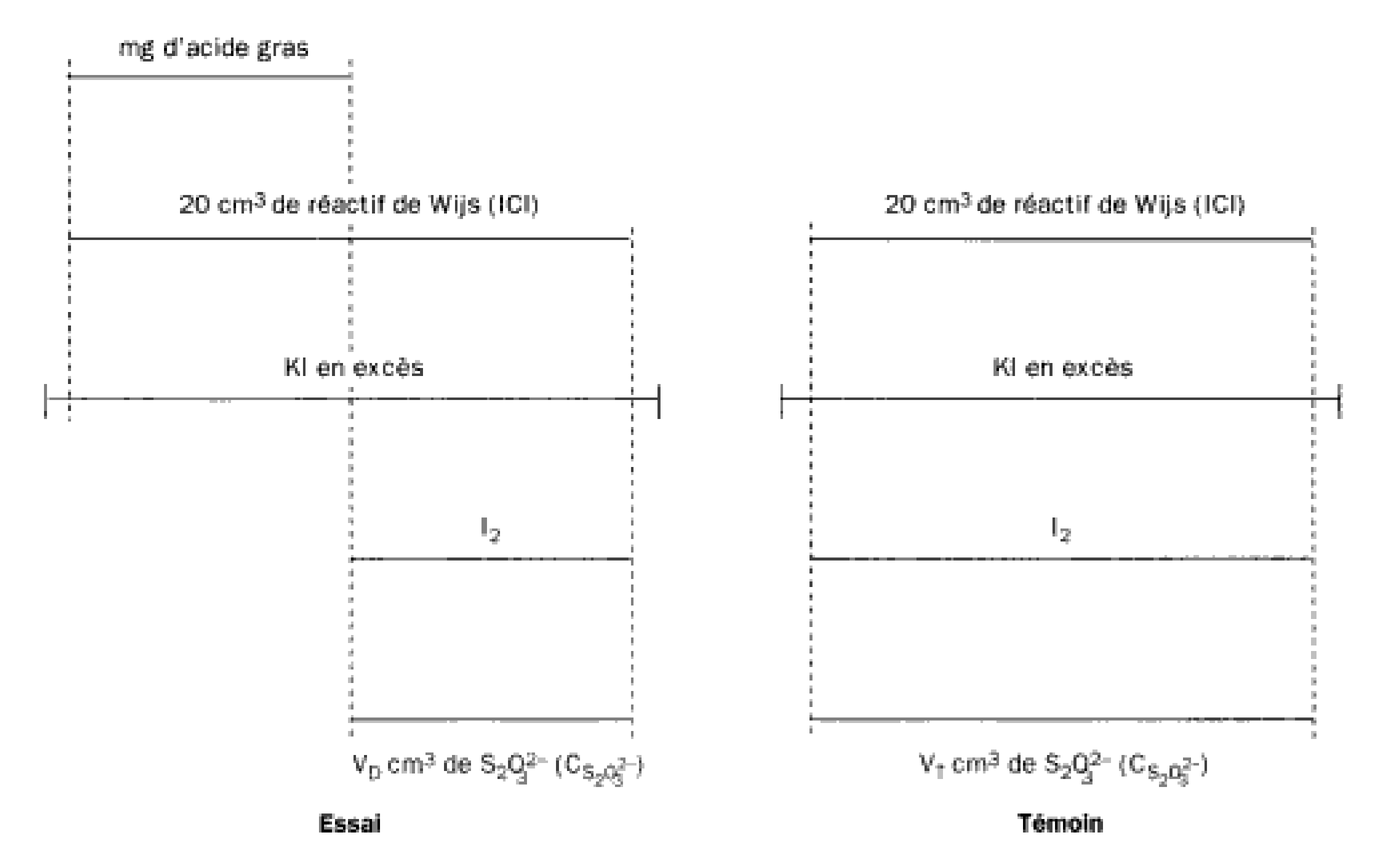


Figure 4.5. Schéma du dosage de l'indice d'iode d'un corps gras.

Le principe de cette expérience consiste à mesurer l'indice d'acide et l'indice d'iode de l'acide palmitique afin de déterminer sa masse molaire et son degré d'insaturation, c'est-à-dire le nombre de doubles liaisons.

Sécurité

La potasse alcoolique 0,2 mol/L est une substance facilement inflammable et irritante, elle ne doit pas être pipetée à la bouche (classe 4, substance critique).
Le mélange butanol/éthanol est facilement inflammable, les deux alcools sont classés comme substances critiques (classe 4 de la classification toxicologique helvétique).
L'acide chlorhydrique est un composé irritant, il est placé dans la classe 3 (poison puissant). Le réactif de Wijs est toxique et irritant, il figure dans la classe 2 (poison très puissant).
Le thiosulfate de sodium, peu toxique, est placé dans la classe 4 (composé critique). Il en est de même de l'iodure de potassium.
Le tétrachlorure de carbone est un composé toxique, nocif et dangereux pour l'environnement. Il figure dans la classe 1* (poison très puissant) ; il est préférable d'utiliser un solvant de remplacement comme le trichloro 1.1.1. éthane (substance peu dangereuse, classe 5). En cas d'utilisation du tétrachlorure de carbone, il faut travailler sous hotte ventilée et refermer immédiatement la fiole erlenmeyer bouchée émeri, ainsi que le flacon de solvant. Eviter toute inhalation, tout contact avec les yeux et la peau.
Ne pas rejeter les solutions à l'évier.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

Solution d'acide oléique à 40 g/L dans un solvant butanol/éthanol (50/50 : V/V).
Réactifs :
- Potasse alcoolique de concentration voisine de 0,2 mol/L :
  - KOH pure pour analyses en pastilles : 13 g, dissoudre dans un minimum d'eau,
  - éthanol pur qsp 1 000 cm^3.

Cette solution ne doit pas être laissée à l'air libre pour éviter la carbonatation.
- Solution de phénolphtaléine à 1 g/L : dissoudre 0,25 g de phénolphtaléine dans de l'éthanol à 95 volumes. Amener le volume à 200 cm^3 environ avec de l'éthanol. Ajouter 0,2 cm^3 de solution d'acide acétique 0,2 mol/L. Compléter le volume à 250 cm^3 avec de l'éthanol.
- Solution d'acide chlorhydrique de concentration molaire connue, voisine de 0,2 mol/L (C_{H^+}).
- Solvant isobutanol-éthanol (50/50 : V/V).
- Réactif de Wijs, commercialisé prêt à l'emploi, par Prolabo.
- Solution d'iodure de potassium à 100 g/L.
- Solution de thiosulfate de sodium de titre connu, voisin 0,2 mol/L.
- Tétrachlorure de carbone ou, de préférence, solvant de remplacement : trichloro 1.1.1. éthane, beaucoup moins toxique.

■ ***Matériel***

- Deux fioles erlenmeyer de 150 cm^3.
- Deux pipettes de 10 cm^3.
- Une poire d'aspiration.
- Une burette.
- Un tube à peser, petit tube de 1 cm de hauteur, ou à défaut, tube à hémolyse.

– Deux fioles de 200 cm^3 bouchant émeri.
– Une pipette de 20 cm^3.
– Une éprouvette de 20 cm^3.
– Une éprouvette de 100 cm^3.
– Une balance de précision.
– Une pipette compte-gouttes.

Mode opératoire

■ ***Détermination de l'indice d'acide***

• *Essai*

Dans un erlenmeyer de 150 cm^3, introduire :
– 10 cm^3 de KOH alcoolique de titre voisin de 0,2 mol/L (poire d'aspiration) ;
– 10 cm^3 de solution d'acide gras à 40 g/L, en solution dans du solvant butanol/éthanol (poire d'aspiration) ;
– 2 gouttes de phénolphtaléine.

Doser par une solution d'acide chlorhydrique de concentration connue voisine de 0,2 mol/L (C_{H+}), soit V_D la chute de burette obtenue.

• *Témoin*

Dans un erlenmeyer de 150 cm^3, introduire :
– 10 cm^3 de KOH alcoolique (poire d'aspiration) ;
– 10 cm^3 de solvant isobutanol/éthanol (éprouvette) ;
– 2 gouttes de phénolphtaléine.

Doser par la solution titrée d'acide chlorhydrique, soit V_T la chute de burette obtenue.

• *Calcul*

L'indice d'acide est égal à :

$$I_A = \frac{56,1 \times C_{H^+} \times (V_T - V_D)}{0,4}$$

■ ***Détermination de l'indice d'iode***

• *Essai*

Dans un tube à peser, peser une masse exacte voisine de 0,2 g d'acide gras à analyser (l'acide palmitique étant liquide, l'introduire dans le tube à peser à l'aide d'une pipette compte-gouttes), soit m gramme la masse pesée.
Introduire le tube contenant l'acide gras dans une fiole erlenmeyer bouchant émeri.
Ajouter 20 cm^3 de trichloro 1.1.1. éthane (éprouvette) et 20 cm^3 de réactif de Wijs (pipette et poire d'aspiration).
Boucher et agiter en évitant toute projection sur le bouchon.
Maintenir la fiole à l'obscurité pendant 20 à 30 minutes en agitant de temps en temps.
Ajouter 100 cm^3 d'eau distillée, puis 20 cm^3 de KI à 100 g/L.
Doser l'iode par la solution titrée de thiosulfate de concentration voisine de 0,2 mol/L ($C_{S_2O_3^{2-}}$).
Entre deux apports de la solution de thiosulfate versée à la burette, boucher la fiole d'erlenmeyer et agiter énergiquement afin de former une émulsion entre les deux phases non miscibles. Il faut extraire l'iode qui se concentre dans la phase organique.
En fin de réaction, les deux phases doivent être incolores. L'emploi d'indicateur de fin de réaction est inutile. Soit V_D la chute de burette obtenue.

• *Témoin*
Dans une fiole bouchant émeri, introduire :
– 20 cm^3 de réactif de Wijs (pipette et poire d'aspiration) ;
– 20 cm^3 de trichloro 1.1.1. éthane (éprouvette) ;
– 100 cm^3 d'eau ;
– 20 cm^3 de KI à 100 g/L.
Doser l'iode formé par la solution titrée de thiosulfate ($C_{S_2O_3^{2-}}$).
Soit V_T la chute de burette obtenue.
• *Calcul*
L'indice d'iode est égal à :

$$I_I = \frac{12,7 \times C_{S_2O_3^{2-}} \times (V_T - V_D)}{m}$$

Résultats, observations et interprétation

La masse molaire de l'acide oléique est égale à :

$$M = \frac{56\ 100}{I_A}$$

Le nombre de doubles liaisons est égal à :

$$n = \frac{I_I \times M}{25\ 400}$$

3. Les lipides, substances de réserve végétales

Mots clés

Oléagineux, glycéride.

Principe

Bien représentés en général chez les végétaux, les lipides peuvent s'y accumuler en grandes quantités : les végétaux oléagineux avec leurs fruits et leurs graines (olive, arachide, noix, ricin, etc.).

Ce sont des glycérides, le glycérol étant associé à des acides variés.

Les lipides sont insolubles dans l'eau, presque toujours très réfringents.

Sécurité

Cette manipulation ne présente aucun danger.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

Graines de Ricin (*Ricinus communis*, Euphorbiacées) ayant séjourné 24 heures dans l'eau.

■ ***Réactifs***

Rouge Soudan III.

Porter à l'ébullition, au bain-marie, 100 mL d'alcool à 70 % (soit environ 75 mL d'alcool à 95 % + 25 mL d'eau distillée). Faire dissoudre du rouge Soudan III jusqu'à saturation. Laisser refroidir et filtrer.

■ ***Matériel***

- Microscope.
- Lames et lamelles.
- Lame de rasoir.
- Scalpel.
- Aiguille lancéolée.
- Feuille de papier.

Mode opératoire

Avec un scalpel, sectionner longitudinalement une graine de Ricin ramollie à la suite de son séjour dans l'eau (*fig. 4.6*). Retirer le tégument externe, rigide.

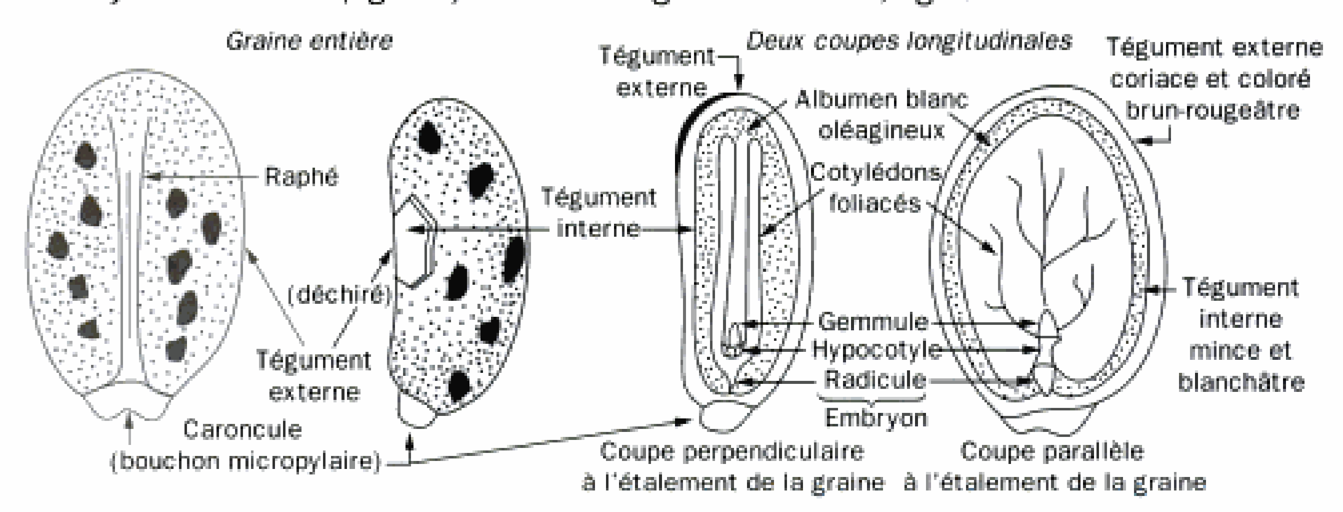


Figure 4.6. La graine du Ricin (Euphorbiacées).

Frotter la tranche sur une feuille de papier : une tache translucide apparaît et ne disparaît pas à la suite d'une évaporation.
A l'aide d'une lame de rasoir, pratiquer ensuite quelques coupes aussi fines que possible dans l'albumen de la graine (à défaut, on peut se contenter d'un simple grattage). Déposer chacune d'elles sur une lame et ajouter une goutte de réactif (rouge Soudan III). Recouvrir d'une lamelle.

Résultats, observations et interprétation

La coupe étant mince, on observe l'huile en place. Par son insolubilité dans l'eau, celle-ci s'accumule sous forme d'enclaves lipidiques, petits globules distribués dans le cytoplasme, en dehors des vacuoles, bien sûr !
Ces enclaves de taille inégale peuvent d'ailleurs confluer à la surface de la coupe *(fig. 4.7)*. Quant aux cellules de l'albumen, elles sont peu « lisibles » ; cependant, leurs parois squelettiques sont minces, sans méats intercellulaires, caractères typiques d'un tissu végétal jeune.

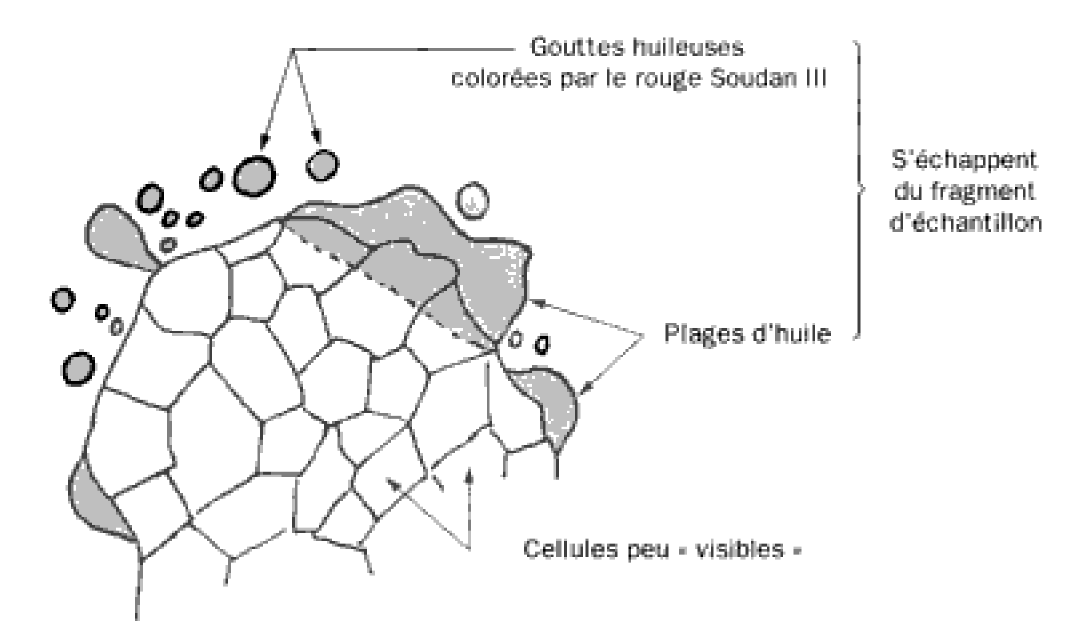


Figure 4.7. Fragment d'albumen de Ricin (Euphorbiacées).

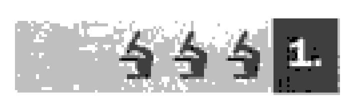
Conclusion

A côté des réserves glucidiques (voir I.2), les lipides hautement énergétiques se rencontrent assez fréquemment dans les organes végétaux qui participent à la reproduction et à la dissémination des espèces (fruits et graines, notamment).
L'homme a depuis longtemps pratiqué l'extraction des huiles végétales. Leurs utilisations sont fort diverses : alimentaires, pharmaceutiques, médicales, industrielles (en savonnerie, pour la préparation des vernis et des peintures, etc.).
On peut distinguer les huiles de fruits (olivier, palmier à huile, etc.), les huiles indigènes de graines (noyer, amandier, colza, etc.), les huiles exotiques de graines (cocotier, arachide, ricin, arbre à huile du Japon, etc.).



Extraction et étude des propriétés spectrales de l'ADN

Sommaire



1. Extraction de l'ADN des hépatocytes de rat

Mots clés

ADN, extraction, hépatocytes.

Principe

L'expérience commence par la destruction de la structure cellulaire en utilisant un broyeur de Potter qui éclate les cellules. Par une centrifugation sélective, on isole les noyaux.

Dans un deuxième temps, on extrait et on purifie l'ADN des noyaux par élimination successive des protéines, des lipides et de l'ARN.

Les protéines sont dissociées de l'ADN à l'aide de détergent (SDS) et de perchlorate de sodium. L'addition d'un solvant organique non miscible (trichloro 1.1.1. éthane contenant un peu d'alcool isoamylique comme agent anti-mousse) permet d'éliminer les lipides et de coaguler les protéines.

A pH 8,3, les acides nucléiques : ADN et ARN, sont extraits dans la phase aqueuse. Après séparation des phases, l'ADN est précipité sélectivement par addition d'éthanol.

Sécurité

Cette manipulation présente un certain nombre de risques relatifs à la toxicité et l'inflammabilité de certains réactifs. Il est à rappeler qu'aucun des réactifs ne doit être pipeté à la bouche.

L'EDTA (Tritiplex III) est un composé nocif. Le Tris [tris (hydroxyméthyl)-aminométhane] est un composé irritant. Le SDS (dodécylsulfate sel de sodium) est nocif et irritant. Le perchlorate de sodium ($NaClO_4$) est un oxydant puissant et est également nocif. Ces produits ne doivent pas être mis en contact avec les yeux, les muqueuses et la peau.

Le trichloro 1.1.1. éthane est relativement peu dangereux, il est placé dans la classe 5 de la classification toxicologique helvétique (substance peu dangereuse).

L'alcool isoamylique est placé dans la classe 4 (substance critique).

L'éthanol est facilement inflammable et doit être utilisé loin de toute flamme.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

Foie de rat fraîchement prélevé et conservé sur de la glace.

■ ***Réactifs***

- Solution STE :
  - saccharose : 250 mmol/L (85,5 g/L),
  - EDTA : 1 mmol/L [Titriplex III (produit Merck) : 0,37 g/L],
  - Tris-HCl : 5 mmol/L pH 7,2 [Tris (hydroxyméthyl)-aminométhane : 0,60 g/L, ajouter HCl 1 mol/L qsp pH 7,2].
- Tampon TE :
  - tampon Tris : 10 mmol/L [Tris (hydroxyméthyl)-aminométhane : 1,20 g/L],
  - EDTA : 1 mmol/L [Titriplex III (Produit Merck) : 0,37 g/L],
  - ajouter HCl 1 mol/L qsp pH 8,3.
- Solution de SDS : dodécylsulfate, sel de sodium : 250 g/L.
- Solution de $NaClO_4$ 5 mol/L : $NaClO_4$, H_2O : 702,3 g/L.

– Mélange trichloro 1.1.1. éthane/alcool isoamylique (24/1 : V/V).
– Ethanol 95 volumes.

■ ***Matériel***

– Broyeur de Potter de Thomas de 30 cm^3.
– Deux bechers de 250 cm^3.
– Glace pilée.
– Ciseaux de dissection gros modèle.
– Petits agitateurs en verre.
– Une pipette graduée de 5 cm^3.
– Une pipette graduée de 2 cm^3.
– Une pipette graduée de 10 cm^3.
– Une poire d'aspiration.
– Une éprouvette de 20 cm^3.
– Une éprouvette de 50 cm^3.
– Une éprouvette de 100 cm^3.
– Une centrifugeuse réfrigérée.
– Papier Joseph.
– Un dessiccateur.
– Un congélateur.
– Un bain thermostaté à 60 °C.

Mode opératoire

■ ***Préparation des noyaux***

Opérer sur un foie de rat fraîchement prélevé sur un animal euthanasié par une personne titulaire de l'habilitation nominative à l'expérimentation animale dans un établissement agréé de l'enseignement supérieur (décret du 19/10/87, arrêté du 19/04/88). Le foie est conservé sur de la glace. Le couper en petits morceaux avec une paire de ciseaux.

Broyer le foie au Potter (Potter de Thomas de 30 cm^3), 5 montées et descentes à 1 000 RPM, en présence de 30 cm^3 environ de STE (solution de saccharose, Tris-HCl, EDTA) *(fig. 5.1)*.

Centrifuger à 600 g*, pendant 10 minutes, à 4 °C, dans un rotor à centrifugation horizontale. Vider le surnageant. Remettre le culot en suspension à l'aide d'une baguette de verre. Diluer avec 30 cm^3 de STE et centrifuger à nouveau pendant 10 minutes à 600 g*.

Remettre en suspension au Potter (manuellement 1 à 2 montées et descentes) en présence de STE, environ 20 cm^3 pour un foie.

Le culot constitue la fraction nucléaire brute qui sera utilisée pour l'extraction de l'ADN.

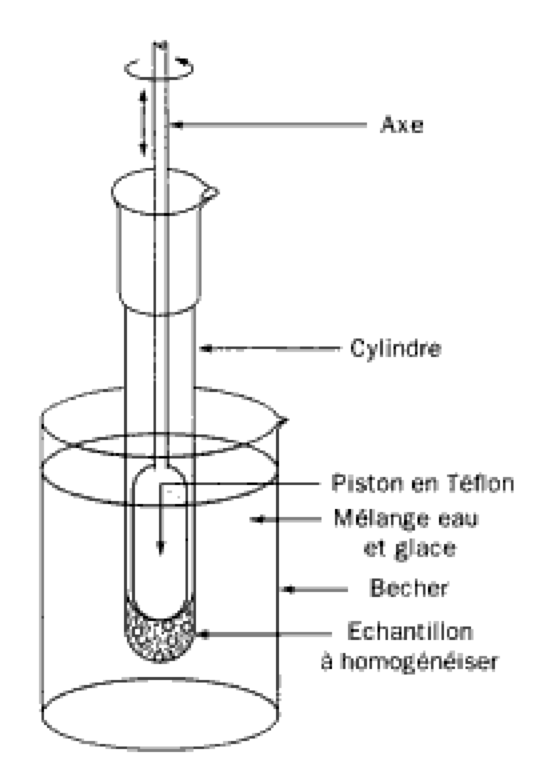


Figure 5.1. Utilisation du broyeur de Potter.

* Calcul du nombre de g (N), à partir de n, la vitesse de rotation exprimée en RPM (rotations par minute) et R, le rayon de centrifugation moyen exprimé par la distance séparant l'axe du rotor et le fond du tube de centrifugation :

$$Ng = (2\pi n)^2 \times R/[(60)^2 \times 9{,}81]$$

■ ***Extraction et purification de l'ADN***

L'ADN étant très sensible à l'action des DNAses omniprésentes, il faut veiller à la propreté rigoureuse de la verrerie et si possible travailler en atmosphère stérile (hotte à flux laminaire ou cône de stérilité d'un bec Bunsen).

Prélever 4 cm^3 de la préparation de noyaux et introduire cette prise dans un flacon de 250 cm^3 avec bouchon hermétique.

Ajouter 25 cm^3 de tampon TE (Tris-EDTA), puis 2 cm^3 de solution de SDS, bien mélanger.

Chauffer le mélange à 60 °C pendant 10 minutes, en agitant de temps à autre.

Ajouter 6 cm^3 de solution de $NaClO_4$ 5 mol/L et 1 volume de mélange de trichloro 1.1.1. éthane et d'alcool isoamylique (24/1 : V/V). Fermer le flacon avec le bouchon et agiter énergétiquement le mélange à la main pendant 5 minutes environ.

Séparer les deux phases en centrifugeant à 1 000 g* pendant environ 5 minutes (utiliser des tubes à centrifuger en verre ou autre matériau résistant au trichloro 1.1.1. éthane.)

Prélever soigneusement la phase aqueuse (phase supérieure). Transvaser celle-ci dans un tube à centrifuger propre. Eviter de prélever les protéines coagulées à l'interface.

Refaire une nouvelle extraction de la phase aqueuse avec 1 volume de mélange de trichloro 1.1.1. éthane et d'alcool isoamylique (24/1 : V : V).

Pendant la centrifugation, passer une baguette de verre à la flamme pour éliminer les nucléases. La poser dans un récipient propre (becher de 250 cm^3). Ne pas toucher l'extrémité de la baguette avec les doigts, l'ADN étant très sensible à l'action des DNAses.

Prélever la phase aqueuse. La transvaser dans une éprouvette de 50 cm^3, en évitant de prélever les protéines coagulées à l'interface. Après avoir noté le volume, transvaser la phase aqueuse dans le becher de 250 cm^3.

Ajouter lentement 2 volumes d'éthanol à 95 volumes froid (stocké au congélateur à – 20 °C), tout en agitant avec la baguette de verre (en tournant toujours dans le même sens). L'ADN précipite sous forme de filaments qui s'enroulent autour de la baguette de verre. Eliminer au maximum l'éthanol en pressant la baguette contre la paroi du récipient. Eponger soigneusement avec un morceau de papier Joseph.

Sécher le produit récupéré dans une capsule, préalablement tarée, placée dans un dessiccateur. Peser le résidu après séchage.

Résultats, observations et interprétation

Calculer la masse m en grammes d'ADN sec obtenu à partir de 4 cm^3 de la préparation de noyaux. Rapporter le résultat en volume d'extrait.

$$M = \frac{m \times V}{4}$$

M (en g) : masse d'ADN sec rapportée à la fraction totale V.

* Calcul du nombre de g (N), à partir de n, la vitesse de rotation exprimée en RPM (rotations par minute) et R, le rayon de centrifugation moyen exprimé par la distance séparant l'axe du rotor et le fond du tube de centrifugation :

$$Ng = (2\pi n)^2 \times R/[(60)^2 \times 9{,}81]$$



2. Caractérisation spectrale de l'ADN

Mots clés

Spectre d'absorption de l'ADN, rapport $A_{260nm}/A_{280\ nm}$.

Principe

L'ADN présente un pic d'absorbance à 260 nm. En évaluant le rapport $A_{260nm}/A_{280\ nm}$, on peut apprécier l'efficacité du procédé de purification, sachant que les protéines présentent un pic d'absorption à 280 nm. Si l'ADN est pur, ce rapport est compris entre 1,65 et 1,85.

Sécurité

Le tampon TE est nocif et irritant, il est interdit de le pipeter à la bouche. Par ailleurs, il faut éviter tout contact avec les yeux, les muqueuses et la peau.

Matière d'œuvre

■ ***Réactifs***

– Tampon TE :
  – tampon Tris : 10 mmol/L [Tris (hydroxyméthyl)-aminométhane : 1,20 g/L],
  – EDTA : 1 mmol/L [Titriplex III (produit Merck) : 0,37 g/L],
  – ajouter HCl 1 mol/L qsp pH 8,3.

■ ***Matériel***

– Un spectrophotomètre UV double faisceau avec enregistreur.
– Deux cuves spectrophotométriques UV (quartz ou plastique transparent aux UV).

Mode opératoire

Dissoudre l'ADN obtenu dans 10 cm^3 de tampon TE. La solubilisation est lente. Ne pas chauffer.
Tracer le spectre UV dans le tampon TE. Balayer le domaine spectral entre 230 et 320 nm. Pour cela, placer dans le faisceau de mesure une cuve contenant la solution d'ADN et dans le faisceau de référence une cuve contenant du tampon TE.

Résultats, observations et interprétation

Noter les valeurs d'absorbance à 260 et 280 nm. Exprimer le rapport $A_{260nm}/A_{280\ nm}$.
Interpréter et conclure.



Caractérisation et dosage de la vitamine C

Sommaire

Page

1. Caractérisation de la vitamine C dans le jus de citron

Mots clés

Vitamine C, jus de citron.

Principe

La vitamine C est l'isomère L de l'acide ascorbique. C'est un acide carboxylique dérivé d'un hexose (acide hexonique) et γ-lactonisé. Elle comporte une fonction ène diol sur les carbones 2 et 3.

Cette fonction ène diol est très oxydable : il se forme alors de l'acide déhydroascorbique *(fig. 6.1)*.

A chaud et à froid, la vitamine C est décomposée par l'oxygène de l'air et par de nombreux oxydants surtout en milieu alcalin. Elle est stable à l'abri de la lumière et relativement thermostable en solution acide ou neutre, lorsqu'elle n'est pas au contact de l'oxygène de l'air.

Parmi les méthodes chimiques de caractérisation de la vitamine C, il existe celles fondées sur le pouvoir réducteur de la vitamine C : réduction de la liqueur de Fehling et réduction du 2-6 dichlorophénolindophénol *(fig. 6.2)*.

Figure 6.1. Equation d'oxydation de la vitamine C.

Figure 6.2. Equation de la réaction d'oxydoréduction entre la vitamine C et le 2-6 dichlorophénolindophénol.

Sécurité

La réaction à la liqueur de Fehling comporte une opération de chauffage. Il est indispensable d'éviter les phénomènes de surchauffe qui risquent de provoquer des projections brûlantes. Entrent dans la composition de la liqueur de Fehling le sulfate cuivrique qui figure dans la classe 3 (poison puissant) de la classification toxicologique helvétique et l'hydroxyde de sodium (classe 2, poison très puissant).

Il faut donc éviter tout contact entre ce réactif et les yeux, les muqueuses et la peau.
La manipulation de l'acide sulfurique concentré (poison très puissant) nécessite le port de lunettes de protection et d'une blouse de coton fermée.
L'acide acétique cristallisable est inflammable et corrosif, il est placé dans la classe 3 (poison puissant).

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***
Citron.

■ ***Réactifs***
– Liqueur de Fehling :
  – solution cuivrique (A) :
  • $CuSO_4$, 5 H_2O pur pa 40 g
  • H_2SO_4 pur 5 cm^3
  • eau distillée qsp 1 000 cm^3
  – solution tartro-sodique (B) :
  • tartrate double de potassium et de sodium (Sel de Seignette) 200 g
  • lessive de soude pure (d = 1,33) 375 cm^3
  • eau distillée qsp 1 000 cm^3
– Solution de 2-6 dichlorophénolindophénol. Dissoudre par petites fractions 0,55 g de 2-6 dichlorophénolindophénol dans de l'eau distillée chaude. Compléter à 1 litre et filtrer. Ajouter 1,25 cm^3 de tampon phosphate pH 6,8. Conserver à l'obscurité (conservation limitée).
– Tampon pH 6,8.

■ ***Matériel***
– Un presse-fruits.
– Un dispositif de filtration sur filtre plissé.
– Deux pipettes graduées de 2 cm^3.
– Une pipette graduée de 5 cm^3.
– Une poire d'aspiration.
– Deux tubes à essais.
– Une pince en bois.
– Une pipette compte-gouttes.
– Une éprouvette de 10 cm^3.

Mode opératoire

Presser le citron, filtrer le jus obtenu sur filtre plissé.

■ ***Réduction de la liqueur de Fehling***
Dans un tube à essais, verser :
– 2 cm^3 de liqueur de Fehling (1 cm^3 de solution cuivrique + 1 cm^3 de solution tartro-sodique) ;
– 1 à 2 cm^3 de jus de citron filtré.
Porter à ébullition, observer le précipité d'oxyde cuivreux rouge.

■ ***Réduction d'une solution de 2-6 dichlorophénolindophénol***
Dans un tube à essais, verser :
– 1 cm^3 de jus de citron ;
– 4 gouttes d'acide acétique cristallisable ;
– 4 cm^3 d'eau distillée bouillie refroidie ;
– 5 cm^3 de solution de 2-6 dichlorophénolindophénol.
Observer la décoloration à froid, par formation d'un leucodérivé.

2. Dosage de la vitamine C dans le jus de citron

Mots clés

Dosage vitamine C, 2-6 dichlorophénolindophénol.

Principe

Ce dosage de la vitamine C est fondé sur la réduction du 2-6 dichlorophénolindophénol *(fig. 6.2)*.

Sécurité

La manipulation de l'acide métaphosphorique (classe 2 de la classification toxicologique helvétique : poison très puissant) nécessite le port de lunettes de protection et d'une blouse de coton fermée.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

Un citron frais.

■ ***Réactifs***

– Solution de 2-6 dichlorophénolindophénol. Dissoudre par petites fractions 0,55 g de 2-6 dichlorophénolindophénol dans de l'eau distillée chaude. Compléter à 1 litre et filtrer. Ajouter 1,25 cm^3 de tampon phosphate pH 6,8. Conserver à l'obscurité (conservation limitée).
– Tampon pH 6,8.
– Solution d'acide ascorbique pur pour analyses à 0,5 g/L dans l'acide métaphosphorique à 20 g/L.
– Solution d'acide métaphosphorique à 20 g/L. Cette solution est préparée extemporanément par dilution d'une solution à 200 g/L. Broyer au mortier quelques morceaux d'acide métaphosphorique vitreux et en peser 20 g. Les laver rapidement en les recouvrant d'eau distillée et en agitant. Rejeter cette eau de lavage. Dissoudre l'acide ainsi lavé dans de l'eau distillée en agitant. Compléter à 100 cm^3. Conserver au réfrigérateur et au maximum une semaine.

■ ***Matériel***

– Un presse-fruits.
– Un dispositif de filtration sur filtre plissé.
– Une burette de 25 cm^3.
– Une fiole erlenmeyer de 150 cm^3.
– Une pipette jaugée de 5 cm^3.
– Une poire d'aspiration.

Mode opératoire

Presser le citron, filtrer le jus obtenu sur filtre plissé.

■ ***Etalonnage de la solution de 2-6 dichlorophénolindophénol***

Dans une fiole erlenmeyer de 150 cm^3, introduire :
– 5 cm^3 de la solution étalon d'acide ascorbique à 0,5 g/L ;
– 15 cm^3 d'eau distillée bouillie et refroidie.

Verser à la burette le 2-6 dichlorophénolindophénol jusqu'à apparition d'une coloration rose pâle persistant pendant 30 secondes. Soit V_1 la chute de burette obtenue.

■ ***Dosage***

Opérer sur :

– 5 cm^3 de jus de citron ;

– 5 cm^3 d'une solution d'acide métaphosphorique à 20 g/L ;

– 10 cm^3 d'eau distillée bouillie et refroidie.

Doser par V_2 cm^3 de solution de 2-6 dichlorophénolindophénol.

Résultats, observations et interprétation

Soit ρ la concentration massique de vitamine C dans le jus de citron et $\rho_{\text{étalon}}$ celle de la solution étalon d'acide ascorbique. On a :

$$\rho = \rho_{\text{étalon}} \times \frac{V_2}{V_1} \text{ g/L de jus de citron.}$$



Les pigments de la feuille verte

Sommaire

Page



1. Séparation des pigments foliaires de l'épinard par chromatographie ascendante sur papier

Mots clés

Chromatographie sur papier, pigments de la feuille verte.

Principe

Les pigments foliaires sont extraits, après broyage, par de l'acétone. Les pigments de l'extrait acétonique sont séparés par chromatographie ascendante sur papier.
Les pigments les plus apolaires seront ceux qui migreront le plus et que l'on retrouvera le plus près du front du solvant, soit, dans l'ordre :
- les carotènes ;
- les phéophytines ;
- les chlorophylles ;
- les xanthophylles.

Sécurité

Le dichlorométhane est placé dans la classe 4 de la classification toxicologique helvétique (substances critiques), donc relativement peu toxique.
Le méthanol est toxique (classe 3 : poison puissant) et facilement inflammable.

Matière d'œuvre

Matériel biologique

Feuilles d'épinard.

Réactifs

- Solvant de chromatographie (étiqueter : inflammable) :
  - dichlorométhane : 98 cm^3,
  - méthanol : 2 cm^3.
- Carbonate de calcium.
- Acétone.

Matériel

- Un dispositif de filtration sur filtre plissé.
- Une éprouvette de 20 cm^3.
- Une fiole erlenmeyer de 100 cm^3.
- Une cuve à chromatographie constituée d'un flacon à col droit de 20 cm de haut ou d'une éprouvette de 250 cm^3, fermé d'un bouchon en liège, traversé par un fil métallique recourbé en forme de crochet *(fig. 7.1A)*.
- Papier Whatman n° 1.
- Un mortier.
- Des capillaires obtenus par étirage de cannes de verre.
- Un thermoventilateur.

Mode opératoire

Préparation de la cuve à chromatographie

Préparer une cuve à chromatographie ascendante sur papier de la manière suivante : prendre un flacon col droit de 20 cm de haut ou une éprouvette de 250 cm^3, bouché hermétiquement à l'aide d'un bouchon de liège traversé d'un crochet métallique *(fig. 7.1A)*.

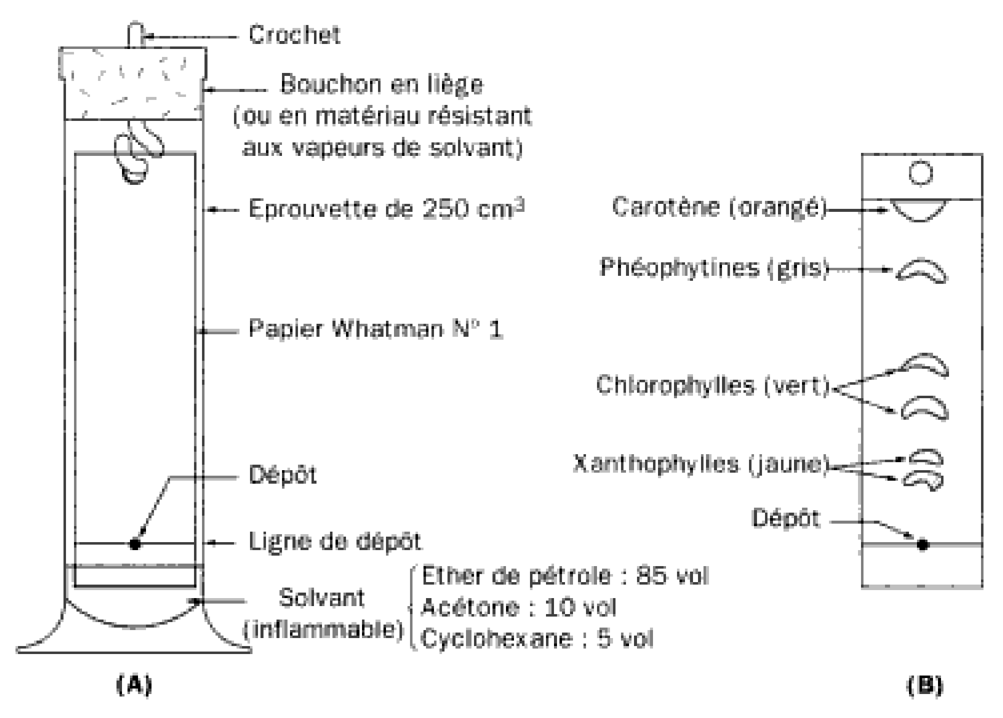


Figure 7.1. Chromatographie ascendante des pigments de la feuille d'épinard.
(A) Le dispositif de chromatographie.
(B) Le chromatogramme.

Découper une feuille de papier Whatman n° 1 aux dimensions de la cuve, en évitant d'y laisser des traces de doigts. Ce papier servira de phase stationnaire. Tracer, au crayon graphite, une ligne de dépôt à 2 cm du bord inférieur de la feuille de papier.
Introduire le solvant de chromatographie, qui constitue la phase mobile sur une hauteur de 1 cm. Laisser saturer pendant 20 à 30 minutes.

■ ***Préparation d'un extrait acétonique des pigments foliaires de l'épinard***
Pendant ce temps procéder à l'extraction des pigments de la feuille d'épinard. Couper 2 à 3 g de feuilles d'épinard en petits fragments. Les introduire dans le mortier en y ajoutant une pointe de spatule de carbonate de calcium, afin de neutraliser les acides organiques. Broyer au mortier. Ajouter 20 cm^3 d'acétone. Continuer de broyer jusqu'à obtention d'une solution vert foncé.
Filtrer sur papier.

■ ***Séparation chromatographique des pigments de l'extrait***
Déposer l'extrait acétonique au milieu de la ligne de dépôt, en déposant 6 à 8 gouttes de l'extrait à l'aide d'une pipette capillaire obtenue par étirage de canne de verre. Le diamètre des gouttes ne doit pas excéder 2 à 3 mm à chaque fois. Sécher au thermoventilateur (sèche-cheveux) entre chaque dépôt.
Introduire la feuille de papier Whatman dans la cuve, l'extrémité supérieure étant fixée au bouchon à l'aide du crochet métallique, l'extrémité inférieure trempant dans le solvant (le dépôt se situant au-dessus de la surface libre du solvant).
Laisser migrer le solvant jusqu'à la partie supérieure de la feuille de papier à chromatographie.

Résultats, observations et interprétation

Dès cet instant, la sortir de la cuve, la sécher au thermoventilateur. Entourer chacun des spots obtenus d'un trait de crayon graphite *(fig. 7.1B)*.
Interpréter.



Séparation et élution des pigments de la feuille d'épinard sur colonne d'alumine Tracé des spectres d'absorption des pigments

Mots clés

Chromatographie d'adsorption sur colonne d'alumine, pigments de la feuille verte.

Principe

Les pigments foliaires sont extraits, après broyage, par de l'acétone. Les pigments de l'extrait acétonique sont séparés par chromatographie d'adsorption sur colonne d'alumine. Les pigments les plus apolaires seront ceux qui migreront le plus vite et qui seront le plus rapidement élués, soit, dans l'ordre :
– les carotènes ;
– les phéophytines ;
– les chlorophylles ;
– les xanthophylles.
L'éluat sera collecté par fractions. On tracera le spectre d'absorption de chacun des pigments recueillis.

Sécurité

Les consignes de sécurité à respecter sont les mêmes que celles de l'expérience précédente (voir I.7.1).

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***
Feuilles d'épinard.

■ ***Réactifs***
– Solvant de chromatographie (étiqueter : inflammable) :
  – dichlorométhane : 98 cm^3,
  – méthanol : 2 cm^3.
– Carbonate de calcium.
– Acétone.

■ ***Matériel***
– Un dispositif de filtration sur filtre plissé.
– Une éprouvette de 20 cm^3.
– Un mortier.
– Une fiole erlenmeyer de 100 cm^3.
– Une colonne de chromatographie : longueur 20 cm, diamètre 1 cm avec robinet *(fig. 7.2)*.
– Suspension d'alumine pour chromatographie, granulométrie 63-200 µm dans le tampon de chromatographie. Dégazer sous vide.
– Un portoir de tubes à essais.
– Un spectrophotomètre visible bifaisceau avec enregistreur, à défaut un spectrophotomètre monofaisceau.

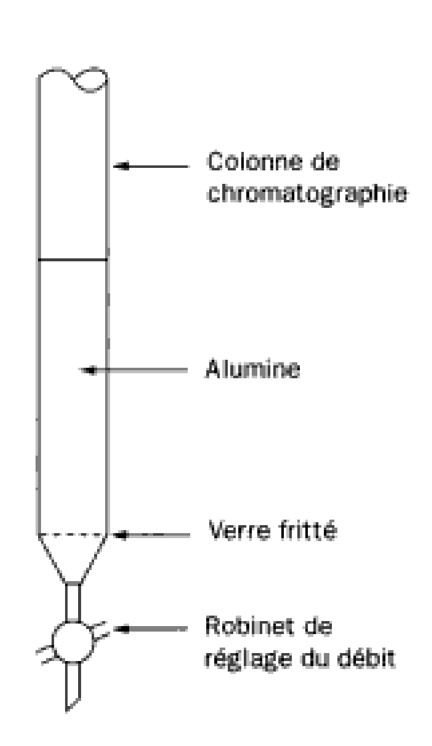


Figure 7.2. Le dispositif de chromatographie sur colonne : la colonne.

– Deux cuves spectrophotométriques en verre (le plastique des cuves à usage unique ne résiste pas au solvant de chromatographie).

Mode opératoire

■ ***Préparation de l'extrait acétonique de pigments foliaires***

Extraire les pigments à l'acétone en utilisant le mode opératoire de l'expérience de la section 1.

■ ***Chromatographie sur colonne d'alumine des pigments de l'extrait acétonique***

Remplir la colonne sur une hauteur de 10 cm avec la suspension d'alumine, sans fissure ni bulle d'air. Le tassement du lit doit être le plus homogène possible.

Déposer 1 cm^3 de l'extrait à analyser, avec un écoulement lent, sans turbulence *(fig. 7.3)*. Faire pénétrer l'extrait en amenant le ménisque supérieur de l'échantillon tangent à l'adsorbant, puis déposer à la surface de l'adsorbant 1 cm^3 de solvant et faire pénétrer en opérant de même.

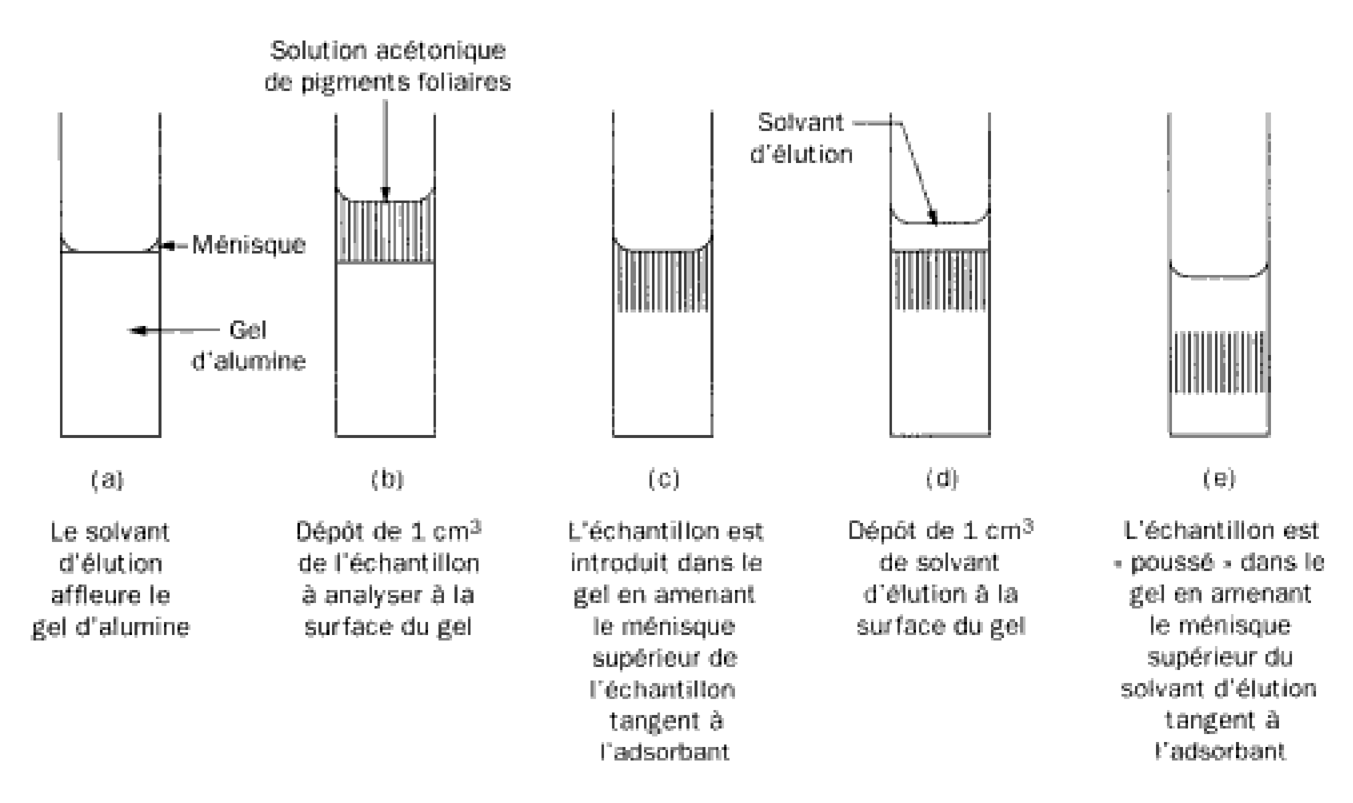


Figure 7.3. Le dépôt de l'échantillon.

Procéder à l'élution : faire percoler le solvant d'élution à vitesse lente (1 goutte toutes les 10 secondes), en veillant à ne jamais laisser le garnissage de la colonne à sec.

Recueillir l'éluat dans des tubes à essais *(fig. 7.4)*, en séparant les constituants de l'extrait acétonique dans l'ordre d'élution : les carotènes, les phéophytines, les chlorophylles et les xanthophylles.

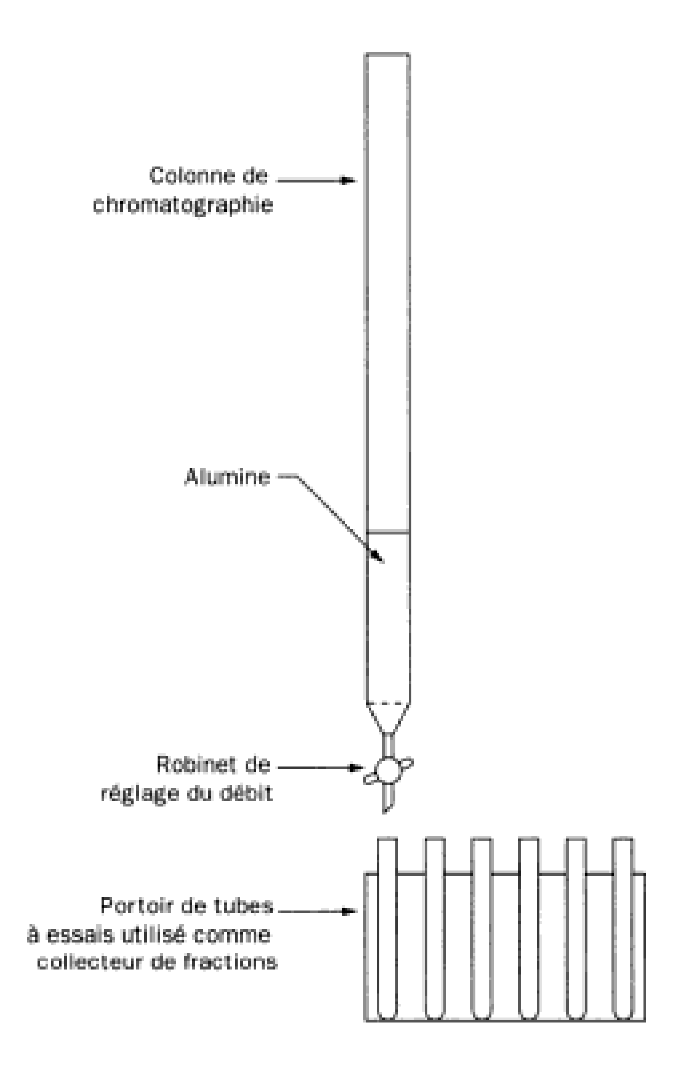


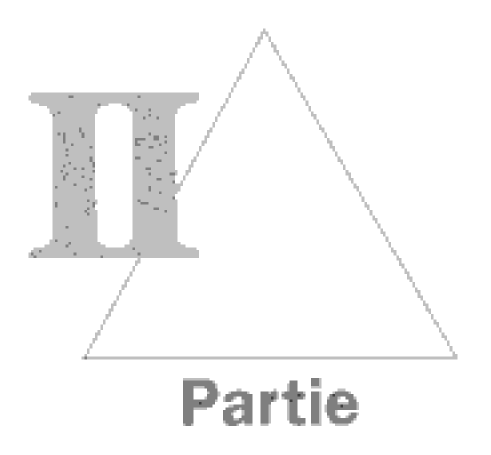
Figure 7.4. Le montage.

■ ***Tracé des spectres***

Tracer le spectre de chacun des pigments en utilisant un spectrophotomètre bifaisceau couplé à un enregistreur (à défaut, tracer le spectre point par point en utilisant un spectrophotomètre monofaisceau).

Balayer le domaine spectral de 680 à 400 nm. Utiliser comme référence une cuve en verre remplie de solvant de chromatographie.

Si éventuellement une absorbance dépassait la valeur 2, diluer la solution de pigment concernée avec du solvant de chromatographie.



Enzymologie



Mise en évidence et propriétés caractéristiques des enzymes

Sommaire

1. Mise en évidence de la lipase pancréatique *in situ*

Se reporter au 4e chapitre « Expérience d'utilisation de la lipase pancréatique *in situ* » (voir I.4.1.1).

2. Digestion *in vitro* de l'amidon par un extrait pancréatique

Mots clés

Hydrolyse enzymatique de l'amidon, amylase, extrait pancréatique.

Principe

Une enzyme est une protéine capable de catalyser spécifiquement la transformation d'un ou de plusieurs substrats. Une enzyme agit à une température et à un pH optimums.
Cette expérience a pour but de démontrer chacune de ces affirmations.
L'enzyme est thermolabile ; chauffée, elle est dénaturée.
L'enzyme est une macromolécule, elle ne dialyse pas.
L'enzyme agit dans une zone de pH et une zone de température qui lui sont spécifiques.

Sécurité

La manipulation ne présente pas de difficultés majeures sur le plan de la sécurité. Les précautions à prendre pour l'utilisation de la liqueur de Fehling ont été décrites p. 26.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique et réactifs***

- Solution tampon phosphate pH 7,1-0,020 mol/L :
  - 50 cm^3 de solution KH_2PO_4 à 3,6 g/L,
  - 32 cm^3 d'une solution NaOH 1 mol/L,
  - eau distillée qsp 1 litre.
- Solution tamponnée de substrat (pH 7,1) : le substrat utilisé est de « l'amidon soluble » préparé par traitement mécanique ou chimique de l'amidon naturel. Dissoudre 1 g d'amidon soluble dans environ 500 cm^3 de solution tampon phosphate pH 7,1-0,020 mol/L. Ajouter 1 g de NaCl. Tiédir si nécessaire. Ajuster à 1 litre avec la solution tampon.
- Solution tamponnée de pancréatine (pH 7,1) : dissoudre 0,25 g de pancréatine 40 U/mg Merck dans 1 litre de tampon phosphate pH 7,1-0,020 mol/L. (Conservation au froid à + 4 °C, quelques heures.)
- Solution d'inuline tamponnée à pH 7,1 : dissoudre 1 g d'inuline dans environ 500 cm^3 de solution tampon phosphate pH 7,1-0,020 mol/L. Ajouter 1 g de NaCl. Tiédir si nécessaire. Ajuster à 1 litre avec la solution tampon.
- Solution de lugol :
  - I_2 4 g
  - KI 8 g
  - eau distillée qsp 1 000 cm^3.
- Solution d'acide chlorhydrique 1 mol/L.
- Solution d'hydroxyde de sodium 1 mol/L.

– Liqueur de Fehling (composition décrite p. 26) :
  – solution A (cuivrique),
  – solution B (tartro-sodique).
– Solution tampon citrate-acide chlorhydrique pH 3 : dissoudre 8,47 g d'acide citrique pur dans 80 cm^3 de soude 1 mol/L. Compléter à 400 cm^3 avec de l'eau distillée. Ajouter 600 cm^3 d'acide chlorhydrique 1 mol/L.
– Solution tamponnée de substrat (pH 3) : dissoudre 1 g d'amidon soluble dans environ 500 cm^3 de solution tampon citrate-acide chlorhydrique pH 3. Ajouter 1 g de NaCl. Tiédir si nécessaire. Ajuster à 1 litre avec la solution tampon.
– Solution tamponnée de pancréatine (pH 3) : dissoudre 0,25 g de pancréatine 40 U/mg Merck dans 1 litre de tampon citrate pH 3. (Conservation au froid à + 4 °C, quelques heures.)
– Solution tampon glycine-soude pH 12 : dissoudre 3,38 g de glycine et 2,63 g de NaCl dans 450 cm^3 d'eau distillée. Compléter à 1 litre avec de la soude 1 mol/L.
– Solution tamponnée de substrat (pH 12) : dissoudre 1 g d'amidon soluble dans environ 500 cm^3 de solution tampon glycine-soude pH 12. Ajouter 1 g de NaCl. Tiédir si nécessaire. Ajuster à 1 litre avec la solution tampon.
– Solution tamponnée de pancréatine (pH 12) : dissoudre 0,25 g de pancréatine 40 U/mg Merck dans 1 litre de tampon glycine-soude pH 12. (Conservation au froid à + 4 °C, quelques heures.)

■ ***Matériel***
– Un bain thermostaté réglable à 37 °C (à défaut, un cristallisoir de grande capacité).
– Un bain thermostaté réglable à 65 °C.
– Un cristallisoir contenant de l'eau et de la glace pilée.
– Un portoir métallique de tubes à essais.
– Des tubes à essais.
– Une pipette jaugée de 5 cm^3.
– Une pipette compte-gouttes.
– Des fioles erlenmeyer de 250 cm^3.
– Une pipette de 2 cm^3.
– Une poire d'aspiration.
– Une éprouvette de 10 cm^3.
– Sac de dialyse : petit morceau de boudin de dialyse noué à chaque extrémité.

Mode opératoire

■ ***Dénaturation thermique***
Préparer un bain d'eau à 37 °C, en utilisant un bain thermostaté ou un cristallisoir de grande capacité.
Préparer 2 tubes à essais contenant chacun 10 gouttes de lugol. Ces tubes sont disposés dans un portoir placé à proximité du bain thermostaté.
Dans une fiole erlenmeyer A de 250 cm^3, introduire 100 cm^3 de solution tamponnée (pH 7,1) d'amidon ; préchauffer à 37 °C cette solution pendant quelques minutes.
Le montage utilisé pour la réaction d'hydrolyse de l'amidon est décrit *figure 2.10*.
Ajouter 5 cm^3 de solution tamponnée (pH 7,1) de pancréatine. Agiter tout en maintenant le mélange réactionnel au bain thermostaté à 37 °C.
Noter le temps zéro qui correspond à l'addition de pancréatine, il correspond au déclenchement de la réaction.
Laisser incuber 20 minutes.

Dans une fiole erlenmeyer B de 250 cm^3, introduire 100 cm^3 de solution tamponnée d'amidon. Préchauffer à 37 °C cette solution pendant quelques minutes.
Ajouter 5 cm^3 de solution tamponnée de pancréatine *préalablement portée à ébullition pendant 5 minutes*, agiter tout en maintenant le mélange réactionnel au bain thermostaté à 37 °C.
Noter le temps zéro qui correspond à l'addition de pancréatine, il correspond au déclenchement de la réaction.
Laisser incuber 20 minutes.
Prélever 5 cm^3 de milieu réactionnel dans chacun des erlenmeyers et introduire chacun des prélèvements dans un tube à essais contenant 10 gouttes de lugol.
Prélever également 2 cm^3 de milieu réactionnel dans chacun des erlenmeyers, et tester à l'aide de la liqueur de Fehling l'apparition d'un pouvoir réducteur.
Dans un tube à essais, introduire :
– 2 cm^3 de solution de liqueur A de Fehling ;
– 2 cm^3 de solution de liqueur B de Fehling ;
– 2 cm^3 de milieu réactionnel.
Porter à ébullition. Rechercher l'apparition d'un précipité rouge.
Pour le milieu réactionnel A, l'amidon a disparu (coloration à l'iode négative), un pouvoir réducteur est apparu.
Pour le milieu réactionnel B, l'amidon n'a pas été transformé, la coloration à l'iode est positive et, de plus, il y a absence de pouvoir réducteur.
Quelle conclusion peut-on apporter à cette partie de l'expérience ?

■ ***Dialyse de l'enzyme***
Réaliser un essai en introduisant l'enzyme, dans le milieu réactionnel, enfermé dans un petit sac de dialyse *(fig. 2.9)*.
Dans une fiole erlenmeyer C de 250 cm^3, introduire 100 cm^3 de solution tamponnée (pH 7,1) d'amidon. Préchauffer à 37 °C cette solution pendant quelques minutes.
Ajouter 5 cm^3 de solution tamponnée de pancréatine enfermée dans un petit sac de dialyse.
Laisser incuber 20 minutes.
Comme il est décrit ci-dessus, faire la réaction à l'iode et à la liqueur de Fehling. La réaction à l'iode est positive, celle à la liqueur de Fehling est négative.
Conclure et interpréter.

■ ***Effet de la température***
Cette expérience a pour but d'étudier le comportement de l'enzyme à 0 °C et à 65 °C.
Dans une fiole erlenmeyer D de 250 cm^3, introduire 100 cm^3 de solution tamponnée (pH 7,1) d'amidon. Préchauffer à 65 °C cette solution pendant quelques minutes et, dans une fiole erlenmeyer E de 250 cm^3, introduire 100 cm^3 de solution tamponnée (pH 7,1) d'amidon. Placer cette solution pendant quelques minutes à 0 °C.
Ajouter, dans chacun des erlenmeyers, 5 cm^3 de solution tamponnée (pH 7,1) de pancréatine. Incuber les 2 milieux réactionnels, l'un (D) à 65 °C, l'autre (E) à 0 °C, pendant 20 minutes.
Faire la réaction à l'iode et à la liqueur de Fehling. Pour chacune des 2 expériences la réaction à l'iode est positive, celle à la liqueur de Fehling est négative ou faible.
Conclure et interpréter.

■ ***Effet du pH***
Cette expérience a pour but d'étudier le comportement de l'enzyme à pH 3 et à pH 12.

Dans une fiole erlenmeyer F de 250 cm^3, introduire 100 cm^3 de solution tamponnée à pH 3 d'amidon et, dans une fiole erlenmeyer G de 250 cm^3, introduire 100 cm^3 de solution tamponnée à pH 12 d'amidon. Préchauffer à 37 °C ces solutions pendant quelques minutes.
Ajouter, dans l'erlenmeyer F, 5 cm^3 de solution tamponnée à pH 3 de pancréatine et, dans l'erlenmeyer G, 5 cm^3 de solution tamponnée de pancréatine tamponnée à pH 12.
Laisser incuber 20 minutes à 37 °C.
Faire la réaction à l'iode et à la liqueur de Fehling. Pour chacune des 2 expériences, la réaction à l'iode est positive, celle à la liqueur de Fehling est négative ou faible.
Conclure et interpréter.

■ ***Spécificité***

Cette expérience a pour but d'étudier le comportement de l'enzyme vis-à-vis d'un substrat polyosidique différent de l'amidon, l'inuline, qui est un polyfructosane [condensation de fructofuranoses reliés en (2 → 1), donc dépourvue de pouvoir réducteur, à l'exclusion d'un résidu fructose en bout de chaîne].
Dans une fiole erlenmeyer H de 250 cm^3, introduire 100 cm^3 de solution tamponnée à pH 7,1 d'inuline. Préchauffer à 37 °C cette solution pendant quelques minutes.
Ajouter, dans l'erlenmeyer H, 5 cm^3 de solution tamponnée à pH 7,1 de pancréatine.
Laisser incuber 20 minutes à 37 °C.
Faire la réaction à la liqueur de Fehling, la réaction à l'iode n'est pas significative. La réaction à la liqueur de Fehling est négative ou faible.
Conclure et interpréter.



Cinétique enzymatique de la phosphatase alcaline

Sommaire

Page

1. Détermination des paramètres cinétiques K_M et V_M

Mots clés

Enzyme, phosphatase alcaline, constante de Michaelis, vitesse maximum.

Principe

La phosphatase alcaline catalyse l'hydrolyse des monoesters de l'acide O-phosphorique. La réaction utilisée pour mesurer l'activité de cette enzyme est l'hydrolyse du paranitrophénylphosphate hexahydraté, sel disodique (PNPP, masse molaire = 371,15 g/mol) *(fig. 9.1)*.

$$NO_2-C_6H_4-O-P(=O)(O^-Na^+)-O^-Na^+ + H_2O \xrightarrow[\text{alcaline}]{\text{Phosphatase}} NO_2-C_6H_4-OH + Na_2HPO_4$$

PNPP (incolore) — PNP (jaune en milieu alcalin)

Figure 9.1. Equation d'hydrolyse du PNPP.

L'un des produits de l'hydrolyse : le paranitrophénol (PNP) est jaune en milieu alcalin et présente un maximum d'absorption à 410 nm.
La réaction est effectuée à pH 9,8, le milieu est tamponné par un tampon diéthanolamine (DEA). La diéthanolamine est un agent transphosphorylant capable de fixer les ions phosphates libérés au cours de la réaction d'hydrolyse.
Pour les réactions à deux substrats dont l'un est en concentration constante et en large excès, ce qui est le cas de cette réaction (l'eau est en concentration constante), la fonction $v_i = f(S_0)$, dans laquelle v_i représente la vitesse initiale et (S_0) la concentration initiale en substrat, vérifie la relation de Michaelis-Menten :

$$v_i = V_M \times \frac{(S_0)}{K_M + (S_0)}$$

K_M est la constante de Michaelis ;
V_M est la vitesse maximum pour une concentration d'enzyme donnée.
Cette expérience consiste à mesurer des vitesses initiales de réaction en faisant varier la concentration initiale de substrat (S_0), en maintenant constants la concentration d'enzyme, le pH, la température. K_M et V_M sont déterminés graphiquement grâce à la représentation de Lineweaver-Burk *(fig. 9.2)*.
La représentation de la fonction $1/v_i = f[1/(S_0)]$, est la plus commode à utiliser car cette fonction est représentée par une droite :

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_M}{V_M} \times \frac{1}{(S_0)} + \frac{1}{V_M}$$

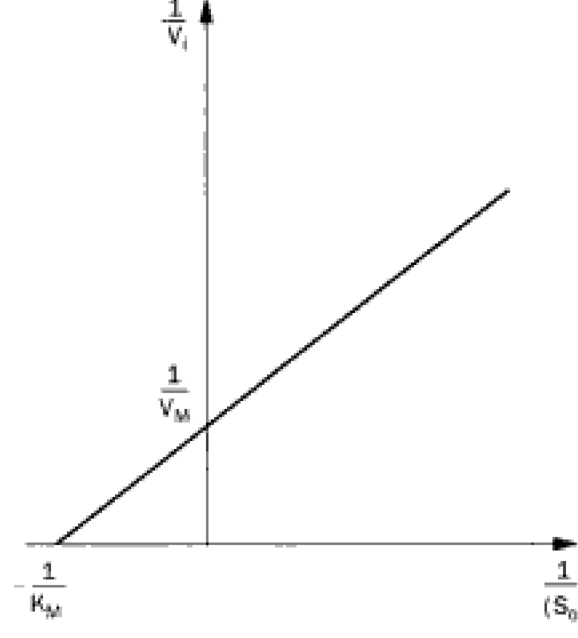


Figure 9.2. Représentation de Lineweaver-Burk.

Sécurité

La diéthanolamine est un composé irritant placé dans la classe 4 de la classification toxicologique helvétique (composé critique).
Le tampon DEA et la solution de PNPP ne doivent pas être pipetés à la bouche.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique et réactifs***

- Solution d'enzyme : préparer une solution de phosphatase alcaline en diluant au 1/2 500 la suspension commerciale de phosphatase alcaline de veau à 1 400 UI/mL et 140 UI/mg dans du tampon DEA (réf. Boehringer 108162). A conserver au froid.
- Solution de substrat : solution de paranitrophénylphosphate disodique, 5 mmol/L.
- Tampon diéthanolamine pH 9,8 (tampon DEA commercialisé par Merck).
- Solution de phosphate 10^{-2} mol/L : solution de Na_2HPO_4, 2 H_2O à 1,78 g/L.

■ ***Matériel***

- Un bain thermostaté réglé à 37 °C.
- Un spectrophotomètre visible.
- Cuves pour spectrophotomètre.
- Tubes à essais.
- Portoir métallique pour tubes à essais.
- Deux pipettes graduées de 5 cm^3.
- Une pipette graduée de 2 cm^3.
- Une pipette jaugée de 2 cm^3.
- Une pipette jaugée de 1 cm^3.
- Une pipette jaugée de 0,2 cm^3.
- Une poire d'aspiration.

Mode opératoire

Préparer 6 tubes (mis en place dans un portoir immergé dans un bain thermostaté à 37 °C), en respectant le mode opératoire présenté dans le *tableau 9.I*.

Tableau 9.I Mode opératoire

Tube n°	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
Tampon DEA, pH 9,8 (en cm^3)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Sol de PNPP 5 mmol/L (en cm^3)	0	0,2	0,3	0,5	1	1,5
Eau distillée (en cm^3)	2,5	2,3	2,2	2	1,5	1
Solution d'enzyme (en cm^3)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
		Incuber chaque tube pendant exactement 2 minutes à 37° C				
NaOH 1 mol/L (en cm^3)	2	2	2	2	2	2
Absorbance mesurée à 410 nm	0					
Concentration du PNPP en mmol/L de milieu réactionnel	0	0,192	0,288	0,480	0,961	1,442

Afin de respecter la durée exacte d'incubation de 2 minutes, il est conseillé de déclencher la réaction par ajout de la solution d'enzyme (agiter le tube immédiatement après l'addition), en décalant les ajouts exactement de minute en minute et de bloquer la réac-

tion 2 minutes exactement après son déclenchement par addition de solution de soude (agiter le tube immédiatement après l'addition).
Les temps de déclenchement et d'arrêt de la réaction doivent être organisés selon un tableau *(tab. 9.II)* :

Tableau 9.II Organisation des temps de déclenchement et d'arrêt de la réaction

Tube n°	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
Déclenchement de la réaction par ajout de la solution d'enzyme au temps t (en min)	0	1	4	5	8	9
Arrêt de la réaction par addition de la solution de soude 1 mol/L au temps t (en min)	2	3	6	7	10	11

Résultats, observations et interprétation

Tracer la courbe $1/A_{410} = f\,[1/(S_0)]$, expression dans laquelle (S_0) est exprimée en mol/L de milieu réactionnel.
Déterminer graphiquement K_M (en mol/L de milieu réactionnel) et V_M en $A_{410^{Max}}$ apparu en 3 minutes.
Calculer V_M en µmol de PNPP hydrolysé par minute et par cm^3 de solution d'enzyme.
Pour cela, appliquer la loi de Beer-Lambert : $A_{410} = \varepsilon_{410} \cdot l \cdot c$
ε_{410} du PNP = $17{,}5.10^3$ mol^{-1}.l.cm^{-1}.
l = trajet optique en cm (l = 1 cm).
c = concentration du PNP en mol/l de milieu de lecture (7,2 cm^3).

$$V_M = \frac{A_{410^{Max}} \times 10^6 \times 7{,}2}{2 \times 17{,}5.10^3 \times 10^3 \times 0{,}2} = A_{410^{Max}} \times 1{,}03$$

2. Influence de la présence d'ions phosphates dans le milieu réactionnel

Mots clés

Inhibition compétitive, phosphate.

Principe

L'expérience consiste à mesurer des vitesses initiales de réaction :
– à concentration constante d'enzyme ;
– à pH constant ;
– à température constante ;
– à concentration initiale de substrat (S_0) variable ;
– en présence de phosphate.

Les résultats de cette expérience permettront de déduire dans quel type d'effecteur il faut classer le phosphate vis-à-vis de la phosphatase alcaline.

Il existe trois types d'inhibitions enzymatiques réversibles.

Note : on appelle (I) la concentration en inhibiteur (en mol/L de milieu réactionnel) et K_I la constante de dissociation du complexe EI.

$$K_I = \frac{(E)\,(I)}{(EI)}$$

■ ***Inhibition compétitive***

Les inhibiteurs compétitifs sont des analogues structuraux du substrat. Ils entrent en compétition avec le substrat pour se fixer sur le site actif de l'enzyme.

Dans certains cas, le produit de la réaction enzymatique ressemble suffisamment au substrat pour être lui-même un inhibiteur de l'enzyme.

Que deviennent les paramètres cinétiques de l'enzyme en présence d'un inhibiteur compétitif ?

K'_M, la constante apparente de Michaelis, est augmentée ; l'affinité de l'enzyme pour son substrat diminue. V_M est inchangée *(fig. 9.3A et B)*.

■ ***Inhibition non compétitive***

Un inhibiteur non compétitif se fixe sur un site de l'enzyme différent du site actif. Il peut se fixer sur l'enzyme libre ou sur le complexe enzyme-substrat.

Que deviennent les paramètres cinétiques de l'enzyme en présence d'un inhibiteur non compétitif ?

La constante de Michaelis K_M est inchangée ; l'affinité de l'enzyme pour son substrat ne varie pas. V_M est diminuée *(fig. 9.4A et B)*.

■ ***Inhibition incompétitive***

L'inhibiteur incompétitif se fixe sur le complexe ES, en un site de l'enzyme différent du site actif.

Que deviennent les paramètres cinétiques de l'enzyme en présence d'un inhibiteur incompétitif ?

La constante de Michaelis K_M est diminuée ; l'affinité de l'enzyme pour son substrat est augmentée. V_M est diminuée *(fig. 9.5A et B)*.

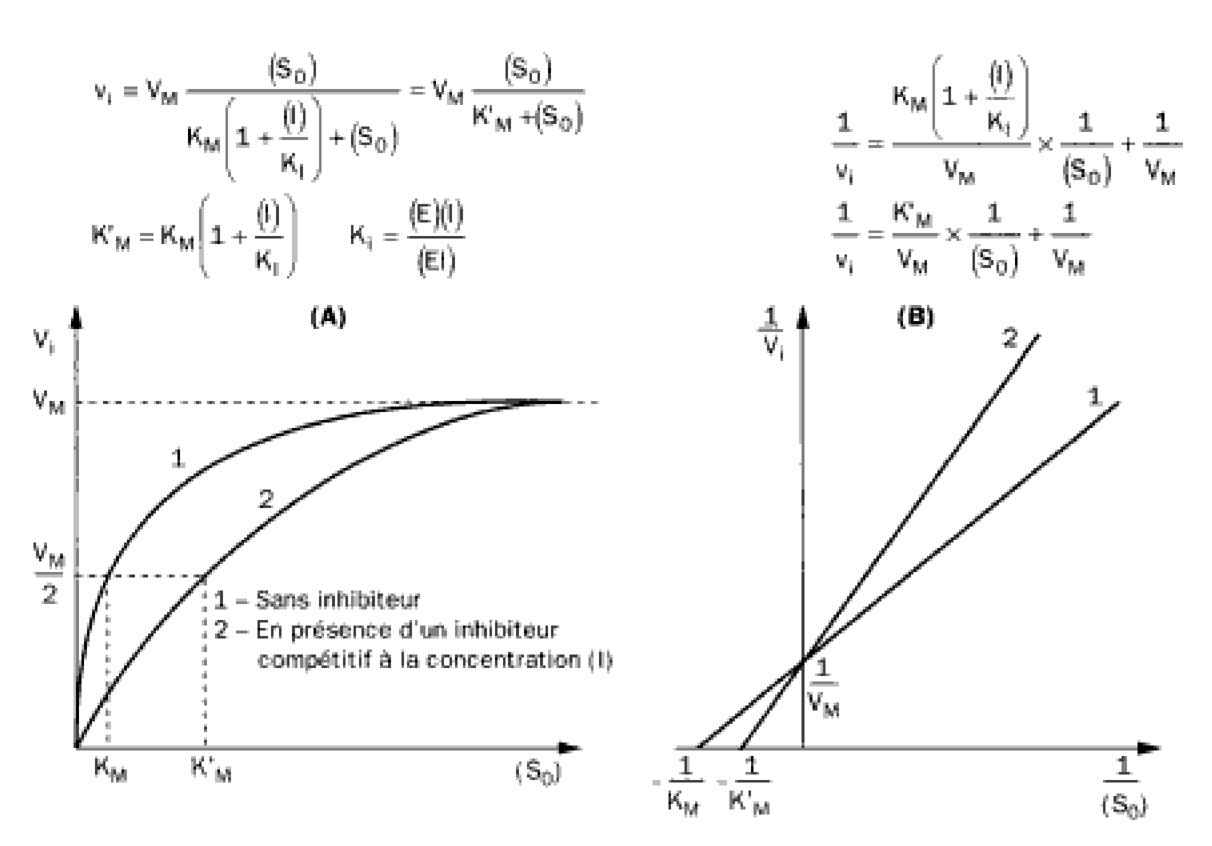


Figure 9.3. Etude cinétique de l'effet d'un inhibiteur compétitif à la concentration (I).
(A) Equation et représentation de Michaelis-Menten.
(B) Equation et représentation de Lineweaver-Burk.

$$v_i = \frac{V_M}{\left(1+\dfrac{(I)}{K_I}\right)} \times \frac{(S_0)}{K_M + (S_0)} = V'_M \times \frac{(S_0)}{K_M + (S_0)}$$

$$V'_M = \frac{V_M}{\left(1+\dfrac{(I)}{K_I}\right)} \qquad K_I = \frac{(E)(I)}{(EI)}$$

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_M}{V_M}\left(1+\frac{(I)}{K_I}\right) \times \frac{1}{(S_0)} + \frac{1}{V_M}\left(1+\frac{(I)}{K_I}\right)$$

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_M}{V'_M} \times \frac{1}{(S_0)} + \frac{1}{V'_M}$$

(A)

v_i — V_M — 1 — V'_M — $\frac{V_M}{2}$ — 2 — $\frac{V'_M}{2}$

1 – Sans inhibiteur
2 – En présence d'un inhibiteur non compétitif à la concentration (I)

K_M — (S_0)

(B)

$\frac{1}{v_i}$ — 2 — 1 — $\frac{1}{V'_M}$ — $\frac{1}{V_M}$ — $-\frac{1}{K_M}$ — $\frac{1}{(S_0)}$

Figure 9.4. Etude cinétique de l'effet d'un inhibiteur non compétitif à la concentration (I).
(A) Equation et représentation de Michaelis-Menten.
(B) Equation et représentation de Lineweaver-Burk.

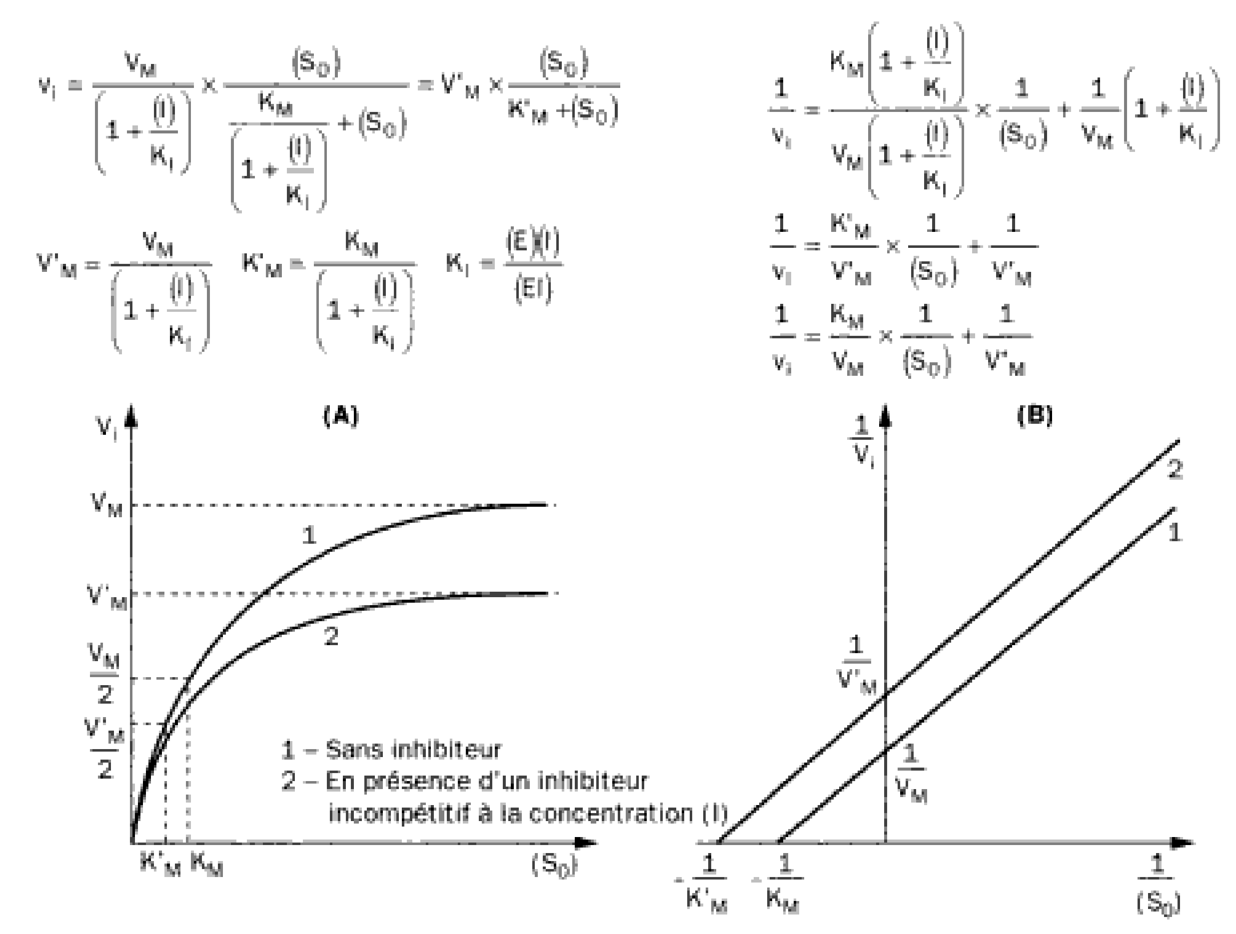


Figure 9.5. Etude cinétique de l'effet d'un inhibiteur incompétitif à la concentration (I).
(A) Equation et représentation de Michaelis-Menten.
(B) Equation et représentation de Lineweaver-Burk.

Mode opératoire

Préparer 6 tubes (mis en place dans un portoir immergé dans un bain thermostaté à 37 °C), en respectant le mode opératoire présenté dans le *tableau 9.III*.

Tableau 9.III Mode opératoire

Tube n°	0	1	2	3	4	5
Tampon DEA, pH 9,8 (en cm^3)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Solution de PNPP 5 mmol/L (en cm^3)	0	0,2	0,3	0,5	1	1,5
Solution de phosphate 10^{-2} mol/L (en cm^3)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Eau distillée (en cm^3)	2	1,8	1,7	1,5	1	0,5
Solution d'enzyme (en cm^3)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
	Incuber chaque tube pendant exactement 2 minutes à 37° C					
NaOH 1 mol/L (en cm^3)	2	2	2	2	2	2
Absorbance mesurée à 410 nm	0					
Concentration du PNPP en mmol/L de milieu réactionnel	0	0,192	0,288	0,480	0,961	1,442

Afin de respecter la durée exacte d'incubation de 2 minutes, il est conseillé de déclencher la réaction par ajout de la solution d'enzyme (agiter le tube immédiatement après l'addition), en décalant les ajouts exactement de minute en minute et de bloquer la réaction 2 minutes exactement après son déclenchement par addition de solution de soude (agiter le tube immédiatement après l'addition).
Les temps de déclenchement et d'arrêt de la réaction doivent être organisés selon un plan préétabli.
Tracer sur le même graphe la courbe $1/A_{410} = f\,[1/(S_0)]$ sans phosphate et la courbe $1/A_{410} = f\,[1/(S_0)]$ avec phosphate.
En déduire l'influence des ions phosphates sur la cinétique de l'enzyme. Déterminer graphiquement K_I (en mol/L de milieu réactionnel).



3. Influence de la concentration en enzyme

Mots clés

Vitesse de réaction enzymatique, influence de la concentration en enzyme.

Principe

La manipulation consiste à mesurer les vitesses initiales de réaction à :
- concentration initiale de substrat (S_0), constante ;
- pH constant ;
- température constante ;
- concentration variable en enzyme.

Dans le cas où la relation de Michaelis est applicable à une réaction enzymatique, la formation du complexe enzyme-substrat peut être représentée par le schéma réactionnel suivant :

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \overset{k_3}{\rightarrow} E + P$$

La vitesse maximale V_M, qui représente la vitesse initiale obtenue lorsque toutes les molécules d'enzyme catalysent la réaction, peut s'écrire :

$$V_M = k_3\,(E_T)$$

L'équation de Michaelis-Menten :

$$v_i = V_M \frac{(S_0)}{K_M + (S_0)}$$

devient :

$$v_i = k_3\,(E_T) \frac{(S_0)}{K_M + (S_0)}$$

Lorsque (S_0) est constante, v_i est proportionnelle à (E_T).

Mode opératoire

Préparer 6 tubes (mis en place dans un portoir immergé dans un bain thermostaté à 37 °C), en respectant le mode opératoire présenté dans le *tableau 9.IV*.

Tableau 9.IV Mode opératoire

Tube n°	0	1	2	3	4	5
Tampon DEA, pH 9,8 (en cm^3)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Solution de PNPP 5 mmol/L (en cm^3)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Eau distillée (en cm^3)	1,2	1	0,8	0,6	0,4	0,2
Solution d'enzyme (en cm^3)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
		Incuber chaque tube pendant exactement 2 minutes à 37° C				
NaOH 1 mol/L (en cm^3)	2	2	2	2	2	2
Absorbance mesurée à 410 nm	0					
Concentration du PNPP en mmol/L de milieu réactionnel	1,442	1,442	1,442	1,442	1,442	1,442

Comme pour les manipulations précédentes, afin de respecter la durée exacte d'incubation de 2 minutes, il est conseillé de déclencher la réaction par ajout de la solution d'enzyme (agiter le tube immédiatement après l'addition), en décalant les ajouts exactement de minute en minute, et de bloquer la réaction 2 minutes exactement après son déclenchement par addition de solution de soude (agiter le tube immédiatement après l'addition).
Les temps de déclenchement et d'arrêt de la réaction doivent être organisés selon un programme préétabli.

Résultats, observations et interprétation

Tracer la courbe $A_{410} = f(E)$, E étant le volume de solution d'enzyme, exprimé en cm^3, introduit dans chaque tube.
Interpréter et conclure.



Etude spectrophotométrique d'un coenzyme, le NAD^+

Etude spectrophotométrique d'un coenzyme, le NAD^+

Mots clés

NAD^+, NADH, spectre d'absorption.

Principe

Le NAD^+ est un coenzyme de structure dinucléotidique, qui participe à de nombreuses réactions d'oxydoréduction, comme transporteur réversible de 2 électrons *(fig. 10.1)*.

$$AH_2 + NAD^+ \rightarrow A + NADH + H^+$$

A partir d'un substrat réduit AH_2, il y a transfert direct de 2 électrons et d'un proton.

AH_2 + NAD^+ ⇌ NADH + A + H^+

H, H, C, C, CONH2, N, R — NAD^+ ; NADH

Figure 10.1. Mécanisme d'action du NAD^+.

Le NAD^+ possède une bande d'absorption UV à λ = 260 nm. La forme réduite présente une bande supplémentaire pour λ = 340 nm *(fig. 10.2)*.

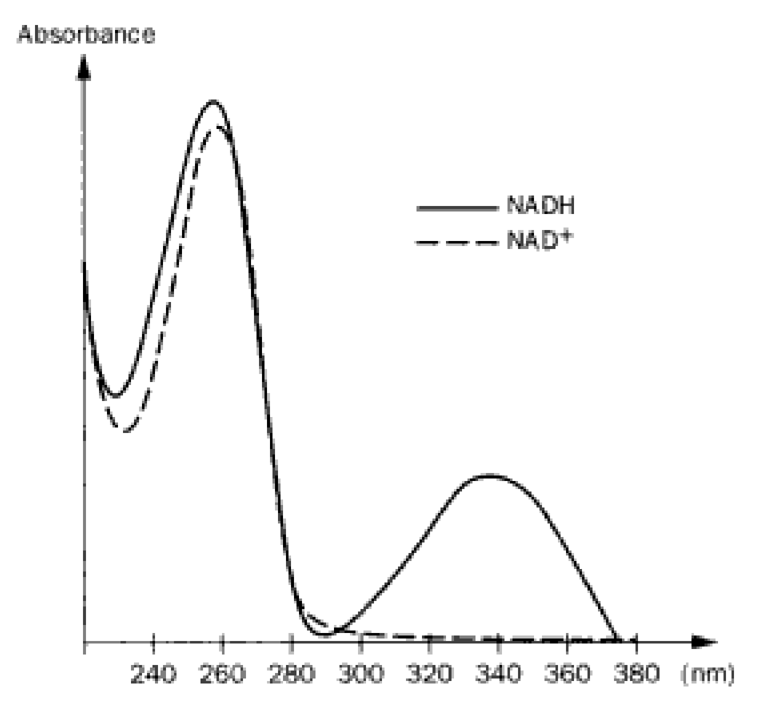


Figure 10.2. Spectres d'absorption du NAD^+ et du NADH.

Sécurité

Cette expérience ne présente aucune difficulté sur le plan de la sécurité.

Matière d'œuvre

■ ***Réactifs***

– Solution de ($NADH$, H^+) : préparer une solution d'amide dihydronicotinique-adénine-dinucléotide, sel disodique (masse molaire = 709,42 g/mol) à 7 mg/100 cm^3 d'eau distillée.
– Solution de NAD^+ : solution d'amide nicotinique-adénine-dinucléotide (masse molaire = 663,44 g/mol) à 6,6 mg/100 cm^3 d'eau distillée.

■ ***Matériel***

– Un spectrophotomètre UV.
– Cuves spéciales UV pour spectrophotomètre.
– Une balance de précision (sensible au 1/10 de mg).
– Une fiole jaugée de 100 cm^3.

Mode opératoire

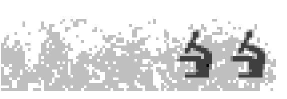
Placer dans le faisceau de mesure une cuve spéciale UV contenant la solution de sel disodique de NADH à 7 mg/100 cm^3 d'eau distillée.
Placer dans le faisceau de référence une cuve spéciale UV contenant de l'eau distillée.
Tracer le spectre de la solution de NADH en balayant le domaine spectral de 380 à 220 nm.
Refaire la même expérience en remplaçant la solution de NADH par la solution de NAD^+ à 6,6 mg/100 cm^3 d'eau distillée.

Résultats, observations et interprétation

Identifier les longueurs d'onde des pics caractéristiques du NADH et de celui du NAD^+.
Sachant que le coefficient d'absorption molaire linéique du NADH à 340 nm est égal à $\varepsilon_{340} = 6{,}3.10^3$ $mol^{-1}.L.cm^{-1}$, déterminer le taux de pureté du sel disodique de NADH utilisé.



Dosage enzymatique du glucose d'un vin blanc doux, méthode « point-final »



Dosage enzymatique du glucose d'un vin blanc doux, méthode « point-final »

Mots clés

Dosage enzymatique, glucose, méthode « point-final ».

Principe

Le D-glucose est phosphorylé en glucose-6-phosphate (G6P), en présence d'hexokinase (HK) et d'adénosine-5'-triphosphate (ATP) :

$$\text{D-glucose} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{HK}} \text{glucose-6-phosphate} + \text{ADP}$$

En présence de glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH), le glucose est oxydé par le nicotinamide-adénine-dinucléotide phosphate ($NADP^+$). Il se forme du nicotinamide-adénine-dinucléotide phosphate réduit :

$$\text{glucose-6-phosphate} + NADP^+ \xrightarrow{\text{G6PDH}} \text{gluconate-6-phosphate} + NADPH + H^+$$

La quantité de NADPH formée au cours de la réaction est proportionnelle à la quantité de D-glucose. On la mesure par l'augmentation de l'absorbance à 340 nm.

Sécurité

Cette expérience ne présente aucune difficulté majeure sur le plan de la sécurité. La triéthanolamine est un composé irritant, mais peu dangereux. Ne pas pipeter à la bouche le tampon triéthanolamine.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

Vin blanc doux non gazeux.

■ ***Réactifs***

Coffret de dosage du D-glucose dans les aliments (réf. Boehringer 716251).

■ ***Matériel***

- Un spectrophotomètre.
- Cuves pour spectrophotomètre.
- Une fiole jaugée de 10 cm^3.
- Une fiole jaugée de 100 cm^3.
- Une pipette de 1 cm^3.
- Une micropipette de 0,1 cm^3, de préférence Pipetman P200 Gilson (réf. Prolabo 01 285 055).
- Une pipette graduée de 2 cm^3.
- Une poire d'aspiration.
- Une micropipette de 20 µl, de préférence Pipetman P Gilson (réf. Prolabo 01 285 011).

Mode opératoire

■ ***Composition du coffret***

Le coffret contient :

- 3 flacons -1- contenant environ 7,2 g de lyophilisat, composé de tampon triéthanolamine pH 7,6, de $NADP^+$: 110 mg, d'ATP : 260 mg, de sulfate de magnésium et de stabilisateurs ;

– 3 flacons -2- contenant environ 1,1 cm^3 de suspension enzymatique composée d'hexokinase (environ 320 UI) et glucose-6-phosphate déshydrogénase (environ 160 UI) ;
– un flacon de solution aqueuse stabilisée de glucose (standard).

Remarque : la solution -1- est stable 4 semaines à + 4 °C et 2 mois à – 20 °C ; le contenu des flacons -2- est stable 1 an à + 4 °C. Il est nécessaire de ramener les solutions réactionnelles à 20-25 °C avant utilisation.

■ ***Préparation des solutions***

– Dissoudre le contenu d'un flacon -1- avec 45 cm^3 d'eau bidistillée.
– Utiliser le contenu d'un flacon -2- sans le diluer.
– Utiliser le contenu du flacon standard tel quel (la concentration est indiquée sur l'étiquette).

■ ***Dilution de l'échantillon***

La quantité de glucose dans la cuve doit être comprise entre 4 et 50 µg. La prise d'essai d'échantillon est comprise entre 0,1 et 2 cm^3, le volume est complété à 2 cm^3 en ajoutant de 1,9 à 0 cm^3 d'eau bidistillée.

Tableau de dilution

Concentration estimée de D-glucose en g/L d'échantillon	Dilution avec de l'eau distillée	Facteur de dilution F
< 0,5	–	1
0,5 à 5	1 + 9	10
5 à 50	1 + 99	100
> 50	1 + 999	1 000

Ne connaissant pas la teneur en glucose du vin blanc, il est conseillé de faire deux essais, l'un en pratiquant une dilution au 1/10, l'autre avec une dilution au 1/100.

■ ***Dosage***

Les essais sont réalisés directement dans la cuve spectrophotométrique, à une température ambiante comprise entre 20 et 25 °C.
Les absorbances sont lues contre l'air (pas de cuve dans le faisceau optique).

Introduire dans les cuves	Témoin	Essai 1 (F = 10)	Essai 2 (F = 100)
Solution -1- (en cm^3)	1	1	1
Echantillon de vin dilué 10 fois (en cm^3)		0, 1	
Echantillon de vin dilué 100 fois (en cm^3)			0,1
Eau bidistillée (en cm^3)	2	1,9	1,9
Mélanger avec une microspatule en plastique ou par retournement sur parafilm. Après 3 minutes environ, lire les absorbances à 340 nm (A_1) contre l'air et déclencher la réaction par addition de :			
Suspension -2- (en cm^3)	0,02	0,02	0,02
Mélanger comme il est indiqué ci-dessus, attendre la fin de la réaction (environ 10 à 15 minutes) et lire les absorbances à 340 nm (A_2) contre l'air. Si la réaction n'est pas terminée après 15 minutes, continuer à lire les absorbances de 5 en 5 minutes jusqu'à obtenir des absorbances (A_2) constantes sur 5 minutes			

Calculer les différences d'absorbance du témoin et de chaque essai :
– $(A_2 - A_1)_{Témoin}$
– $(A_2 - A_1)_{Essai1}$
– $(A_2 - A_1)_{Essai2}$
Déduire la différence d'absorbance du témoin de celle de chaque essai, on obtient :
– $\Delta A_{Essai1} = (A_2 - A_1)_{Essai1} - (A_2 - A_1)_{Témoin}$
– $\Delta A_{Essai2} = (A_2 - A_1)_{Essai2} - (A_2 - A_1)_{Témoin}$

Résultats, observations et interprétation

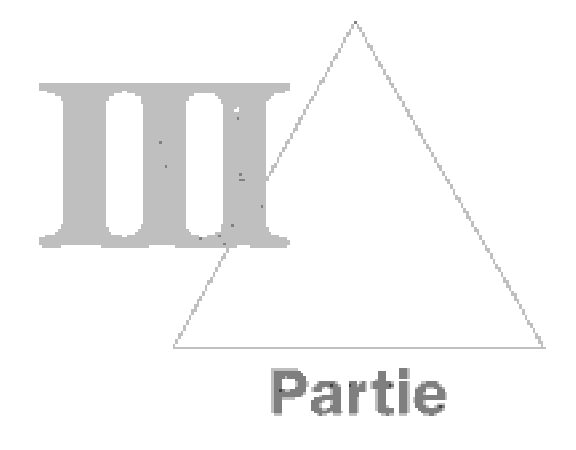
En appliquant la loi de Beer-Lambert, la formule générale pour le calcul des concentrations dans le vin dilué devient :

$$C = \frac{3{,}02 \times 180 \times \Delta A}{\varepsilon \times d \times 0{,}1} \text{ g/L}$$

ε est le coefficient d'absorption molaire linéique du NADPH à 340 nm, sa valeur est $6{,}3.10^3$ $mol^{-1}.L.cm^{-1}$.
d est le trajet optique exprimé en cm (d = 1 cm).
La formule du calcul de la concentration de glucose dans le vin non dilué s'écrit :

$$c = 0{,}863 \times \Delta A \times F \text{ g/L}$$

■ ***Contrôle du dosage***
Le standard (solution -3-) est utilisé pour l'essai à la place de l'échantillon.
La concentration est mentionnée sur l'étiquette.



Partie

Microbiologie



Les manipulations stériles en microbiologie

Sommaire

Page

Les manipulations stériles en microbiologie

Le but de ces manipulations consiste à apprendre les rudiments du travail stérile qui permettront d'effectuer quelques expériences simples en microbiologie.

Sécurité

■ ***La tenue***

Le manipulateur doit être vêtu d'une blouse en coton, à manches longues, entièrement boutonnée (y compris les boutons des manches). La blouse doit être régulièrement lavée. Les fantaisies vestimentaires et décoratives doivent être proscrites : bas de manches en dentelles, bracelets, breloques, etc.

■ ***Le laboratoire***

Le laboratoire de microbiologie est un lieu d'une extrême propreté, on ne désinfecte bien qu'un local et des objets propres.
La paillasse doit être désinfectée avant et après la manipulation à l'eau de Javel ou à l'aide d'un désinfectant bactéricide, fongicide et viricide. Le matériel y est disposé selon une organisation rationnelle et ergonomique. Aucune affaire personnelle ne doit être placée sur la paillasse.
Il ne doit pas y avoir de courants d'air qui peuvent transporter des microbes, le chauffage ou la climatisation par air pulsé sont à proscrire. Fenêtres et portes doivent être maintenues fermées.

■ ***Le matériel***

Le matériel est stérilisé avant et après utilisation. Les objets en verre ou en métal sont stérilisés au four Pasteur (chaleur sèche), pendant 30 minutes à 180 °C.
Les milieux de culture, les liquides en général, sont stérilisés à l'autoclave (chaleur humide), en général à 120 °C, sous 1 bar de pression, pendant 20 minutes.
Le matériel à usage unique en plastique est stérilisé par voie chimique (oxyde d'éthylène) ou par rayonnement UV.
Les liquides thermolabiles sont stérilisés par filtration. Le procédé le plus pratique consiste à utiliser des filtres membranes dont le diamètre des pores est égal à 0,45 µm (sont éliminés les bactéries et les champignons, mais pas les virus).
Le petit matériel d'usage courant : anse de platine (ôse), fil droit, pipette Pasteur, est stérilisé à la flamme.
Après chaque expérience, le matériel est désinfecté par trempage dans de l'eau de Javel ou stérilisé à l'autoclave avant d'être jeté ou réutilisé.
Les lames, lamelles et les pipettes utilisées sont mises à tremper dans de l'eau de Javel diluée (10° chlorométriques).
Les cultures à détruire sont autoclavées avant d'être jetées ; seul le matériel en verre est récupéré après cette opération et lavé en machine.

■ ***Le manipulateur***

Les cheveux longs doivent être attachés.
Les mains doivent être lavées avec un savon bactéricide (ne pas utiliser le désinfectant utilisé pour décontaminer les paillasses qui est irritant pour la peau), avant et après chaque manipulation.
Ne jamais manger ni boire dans le laboratoire, ne pas porter les mains à la bouche. Ne pas parler, éternuer, tousser pendant une manipulation stérile. Ne pas toucher d'objets personnels pendant la manipulation.

Ne rien pipeter à la bouche, utiliser une poire d'aspiration. Le manipulateur doit être à jour pour les vaccinations obligatoires.

■ ***L'atmosphère stérile autour du bec Bunsen***

Le bec Bunsen assure la combustion d'un gaz carburant (gaz de ville ou gaz butane) en utilisant l'oxygène de l'air comme comburant. Il se crée autour de la flamme une zone où l'air est stérilisé par passage dans la flamme. C'est dans cette zone que s'effectuent les manipulations stériles *(fig. 12.1)*.
Le diamètre maximum de la zone de travail qui est piriforme se situe à la hauteur du cône bleu de la flamme. C'est préférentiellement à cette hauteur que s'effectueront les opérations de travail stérile.

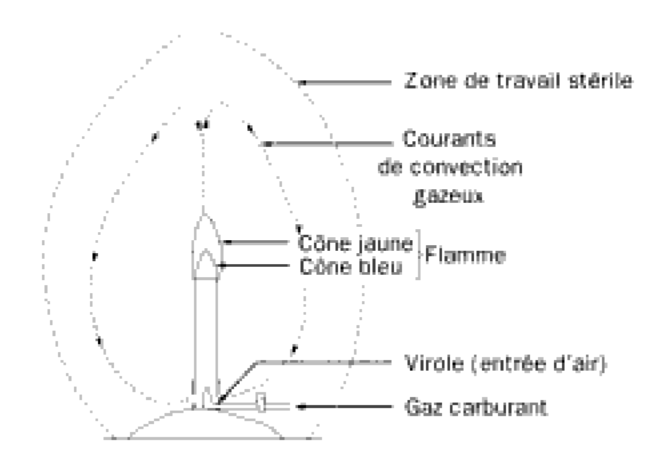


Figure 12.1. Le cône de stérilité engendré par la combustion du gaz dans un bec Bunsen.



1. Confection de pipettes Pasteur stériles

Mots clés

Pipettes Pasteur.

Matière d'œuvre

– Canne de verre de 8 mm de diamètre extérieur et de 6,2 mm de diamètre intérieur.
– Coton cardé.
– Tige d'acier inoxydable de 2 mm de diamètre.

Mode opératoire

Couper de la canne de verre (diamètre externe de 8 mm, diamètre interne de 6,2 mm) à 30 cm de long. Border les extrémités à la flamme. Après refroidissement, boucher les extrémités au coton cardé en s'aidant d'une tige métallique de 2 mm de diamètre *(fig. 12.2A)*.
Les pipettes sont rassemblées par paquets de 20, entourées d'une feuille de papier filtre et stérilisées au four Pasteur à 170 °C, pendant 30 minutes.
Pour procéder à l'étirage d'une pipette Pasteur, il faut la chauffer en son centre sur une longueur de 5 cm environ. Pour cela, placer le milieu de la pipette à la pointe du cône bleu de la flamme *(fig. 12.2B)*, incliner la canne de verre de façon à bénéficier de la plus grande longueur de chauffe et lui imprimer un mouvement de rotation. Ne pas tirer sur les extrémités de la canne de verre pendant la période de chauffage. Lorsque le verre a atteint une consistance suffisamment pâteuse, sortir la canne de verre de la flamme, l'étirer de façon à obtenir une effilure de 42 à 46 cm de long (pas plus sinon la pipette serait trop fine) et, tout en tirant, imprimer des mouvements de rotation dans un sens puis dans l'autre *(fig. 12.2C)*.
Laisser refroidir la pipette sous tension contrôlée afin qu'elle ne se déforme pas.

Procéder à la séparation des 2 pipettes correspondant aux deux moitiés de la canne de verre initiale, en chauffant l'effilure en son milieu, sans tirer, à un endroit où la flamme n'est pas trop chaude (base du cône bleu) *(fig. 12.2D)*.
Obturer les deux pipettes formées en les « boutonnant » ; pour cela placer les 2 effilures verticalement en haut du cône jaune de la flamme *(fig. 12.2E)*.

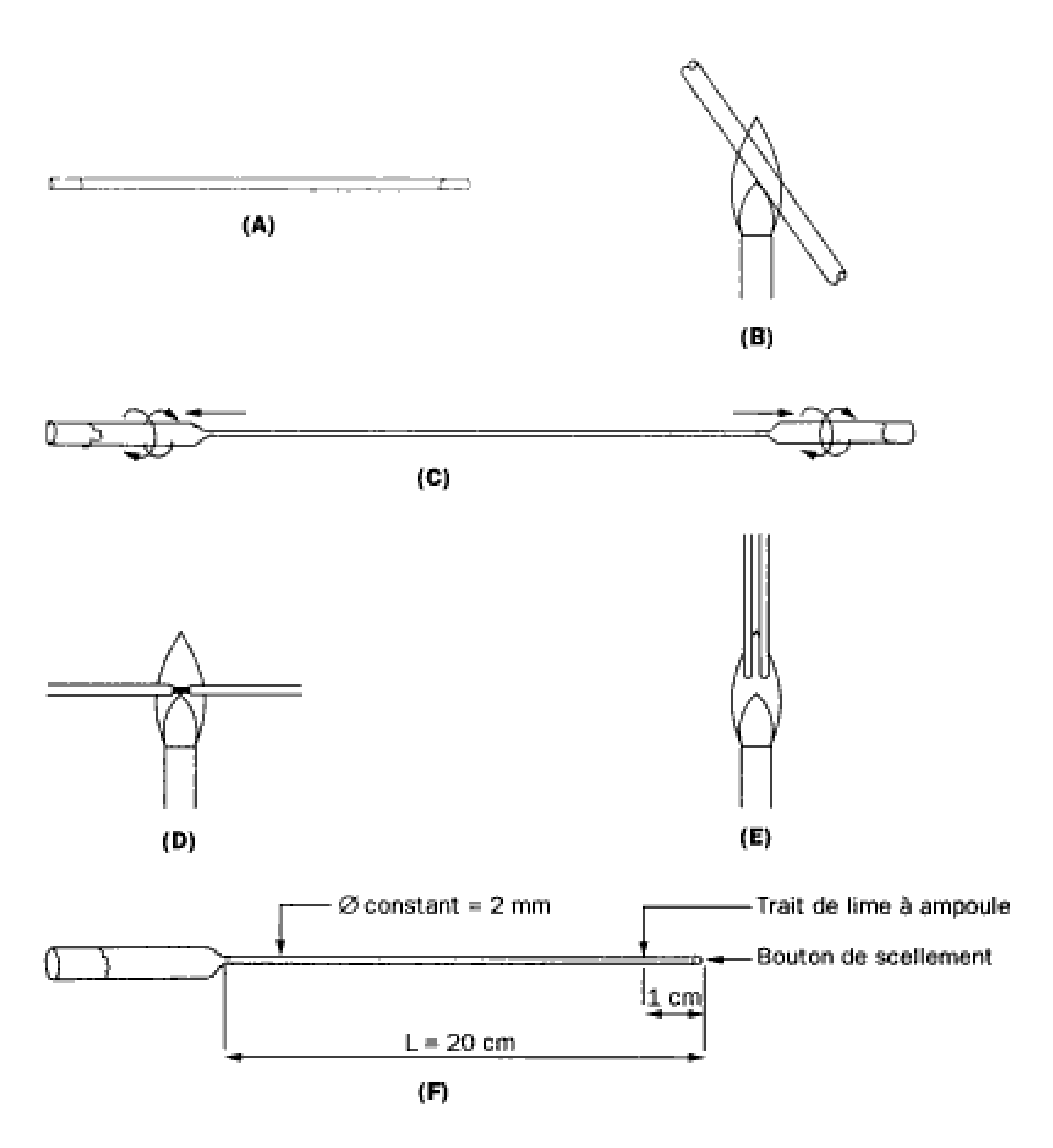


Figure 12.2. Confection d'une pipette Pasteur.
(A) La canne de verre stérile bouchée au coton cardé, avant étirage.
(B) Le chauffage de la canne de verre.
(C) L'étirage.
(D) La séparation des 2 pipettes.
(E) L'obturation par « boutonnage » des 2 pipettes.
(F) Pipette Pasteur terminée.



2. Transfert liquide-liquide

Mots clés

Manipulations aseptiques, transferts stériles liquide-liquide.

Principe

Le but de cette expérience consiste à transférer stérilement 10 gouttes d'eau stérile dans un tube de bouillon ordinaire.
L'absence de pousse après 24 heures d'incubation à 37 °C indiquera que la manipulation a été exécutée dans des conditions d'asepsie correctes.

Matière d'œuvre

■ ***Réactifs et milieux***
- Un tube d'eau distillée stérile.
- Un tube de bouillon ordinaire.

■ ***Matériel***
- Une pipette Pasteur.
- Une lime à ampoule.
- Une poire d'aspiration adaptable à la pipette Pasteur.
- Une étuve de bactériologie réglée à 37 °C.

Mode opératoire

L'organisation de la paillasse est décrite à la *figure 12.3*.
Graver à 1 cm du bouton terminal d'une pipette Pasteur un trait de lime à ampoule.
Adapter la poire d'aspiration sur la pipette Pasteur.
Prendre le tube d'eau dans la main gauche ; le dévisser en se plaçant dans l'atmosphère stérile du bec Bunsen, le bouchon est tenu entre l'auriculaire et la paume de la main droite *(fig. 12.4A)*.
Passer très rapidement le haut du tube dans la flamme *(fig. 12.4B)*. Saisir la pipette Pasteur munie de la poire d'aspiration de la main droite. Il faudra prévoir au préalable de disposer le verre à pied qui la contient à proximité de la zone de stérilité *(fig. 12.3)*.

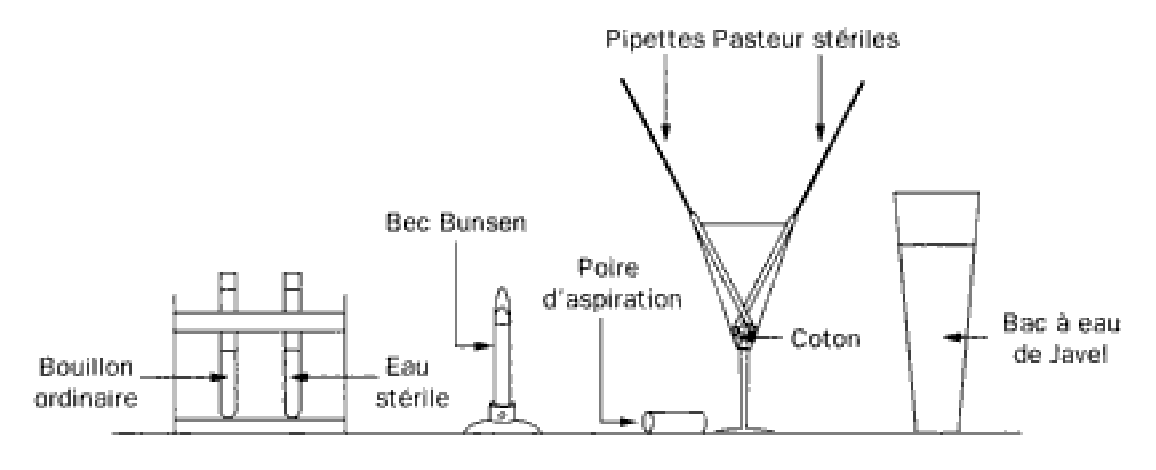


Figure 12.3. Organisation du plan de travail pour un transfert stérile liquide-liquide.

Casser l'extrémité de la pipette au niveau du trait de scie à ampoule, la stériliser en la passant très rapidement 2 fois dans la flamme (elle ne doit pas fondre).
Plonger l'extrémité refroidie de la pipette dans le tube d'eau stérile. Après plusieurs pressions sur la poire, remplir la pipette *(fig. 12.4C)*.
Passer à nouveau le haut du tube dans la flamme, le reboucher et le poser dans le portoir.
A ce moment, la main gauche est libre et la main droite maintient la pipette pleine d'eau stérile dans la zone de stérilité.

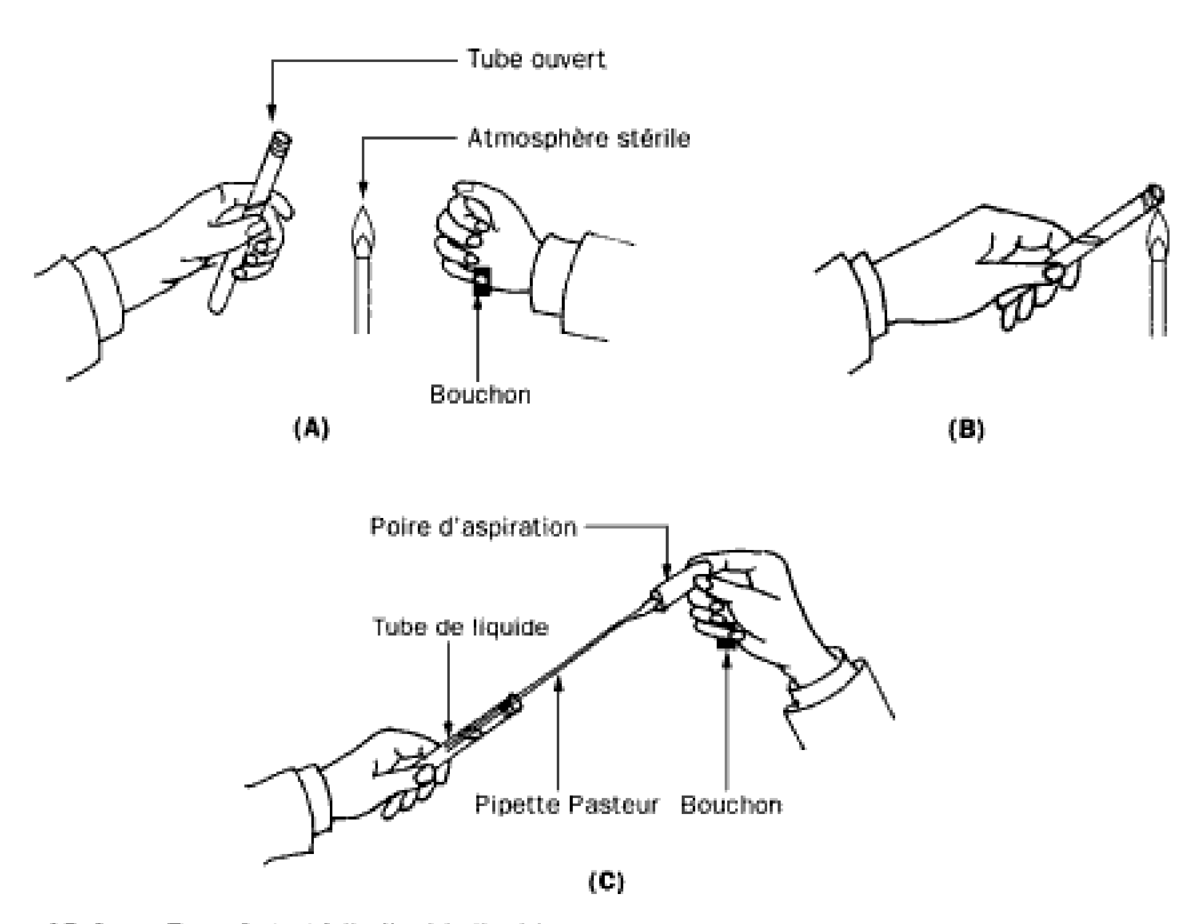


Figure 12.4. Transfert stérile liquide-liquide.
(A) Dévissage d'un tube.
(B) Stérilisation à la flamme du haut du tube.
(C) Remplissage de la pipette Pasteur.

De la main gauche, saisir le tube contenant le bouillon ordinaire stérile. Le dévisser en opérant de la même manière que pour le tube d'eau. Passer le haut du tube dans la flamme. Y introduire la pipette Pasteur pleine. Compter 10 gouttes d'eau. Repasser le haut du tube de bouillon ensemencé dans la flamme, le reboucher et le poser dans le portoir. Jeter la pipette dans le bac à eau de Javel.
Incuber le tube ainsi préparé pendant 24 heures à 37 °C.

Résultats, observations et interprétation

L'absence de trouble, indication d'une absence de culture, est le signe d'une manipulation exécutée dans des conditions d'asepsie convenables.



3. Transfert liquide-solide

Mots clés

Manipulations aseptiques, transferts stériles liquide-solide.

Principe

Le but de cette manipulation consiste à faire un « isolement » à partir d'eau stérile sur gélose trypticase-soja. L'absence de culture après 24 heures d'incubation à 37 °C indiquera que la manipulation a été exécutée dans des conditions d'asepsie correctes.

Matière d'œuvre

■ ***Réactifs et milieux***

– Un tube d'eau distillée stérile.
– Une gélose trypticase-soja (GTS), coulée en boîte de Pétri et séchée en la plaçant ouverte dans une étuve à 37 °C pendant 30 minutes.

■ ***Matériel***

– Une öse.
– Une étuve de bactériologie réglée à 37 °C.
– Une pipette Pasteur boutonnée.

Mode opératoire

L'organisation de la paillasse est décrite à la *figure 12.5.*

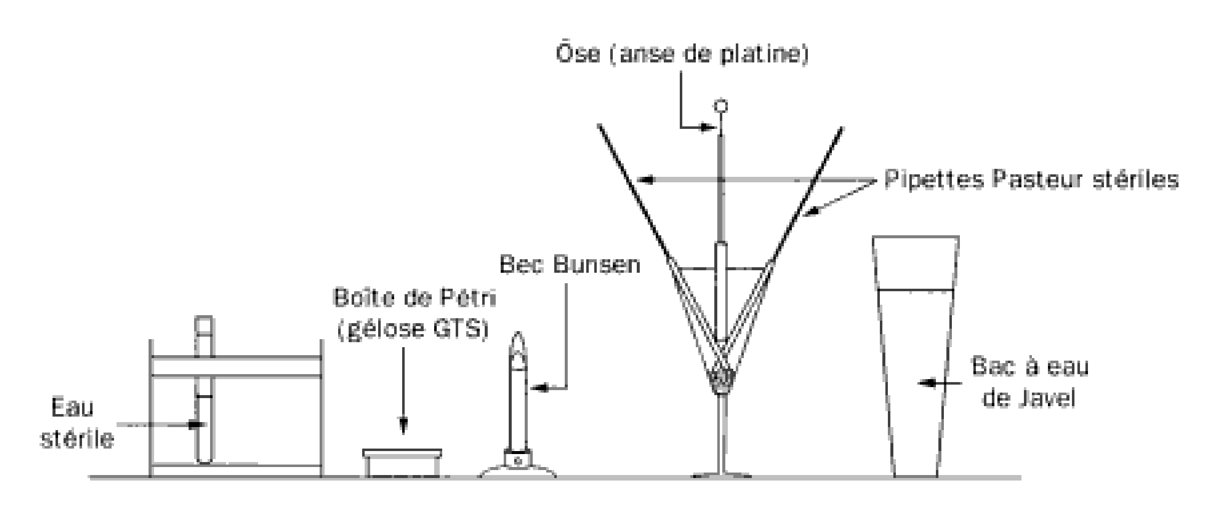


Figure 12.5. Organisation du plan de travail pour un transfert stérile liquide-solide.

Tracer sur l'envers du fond de la boîte contenant la gélose le schéma de l'isolement par la méthode des quadrants *(fig. 12.7A).*
Stériliser l'öse. Pour cela placer l'anse verticalement dans la flamme jusqu'à incandescence, puis passer le fil horizontalement dans la flamme en stérilisant également le mandrin de serrage du fil *(fig. 12.6).*
L'öse est utilisable après refroidissement (30 s à 1 min) ; bien entendu, elle est maintenue dans la zone de stérilité durant cette période.

Charger l'öse d'eau distillée. Pour cela, saisir le tube d'eau dans la main gauche, le dévisser comme il est indiqué *figure 12.4*. Le bouchon est tenu dans la main droite entre l'auriculaire et la paume de la main.

Plonger dans le tube d'eau l'extrémité de l'öse refroidie. Reboucher le tube d'eau. Le placer sur le portoir.

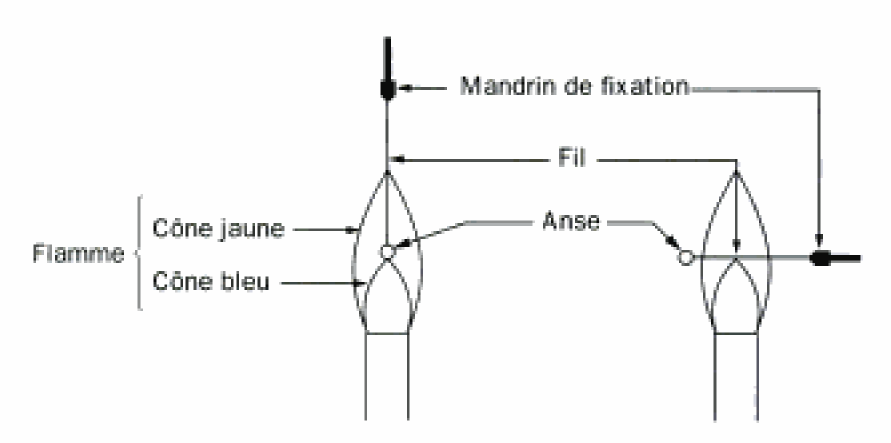


Figure 12.6. Stérilisation de l'öse à la flamme.

De la main gauche, saisir la boîte de Pétri, la poser sur la paillasse près du bec, dans la zone de stérilité. Entrouvrir la boîte et maintenir le couvercle ouvert de la main gauche. Déposer une anse pleine d'eau distillée au point A de la surface sèche de la gélose *(fig. 12.7B)*.

Stériliser l'öse, la reposer dans le verre à pied destiné à cet effet.

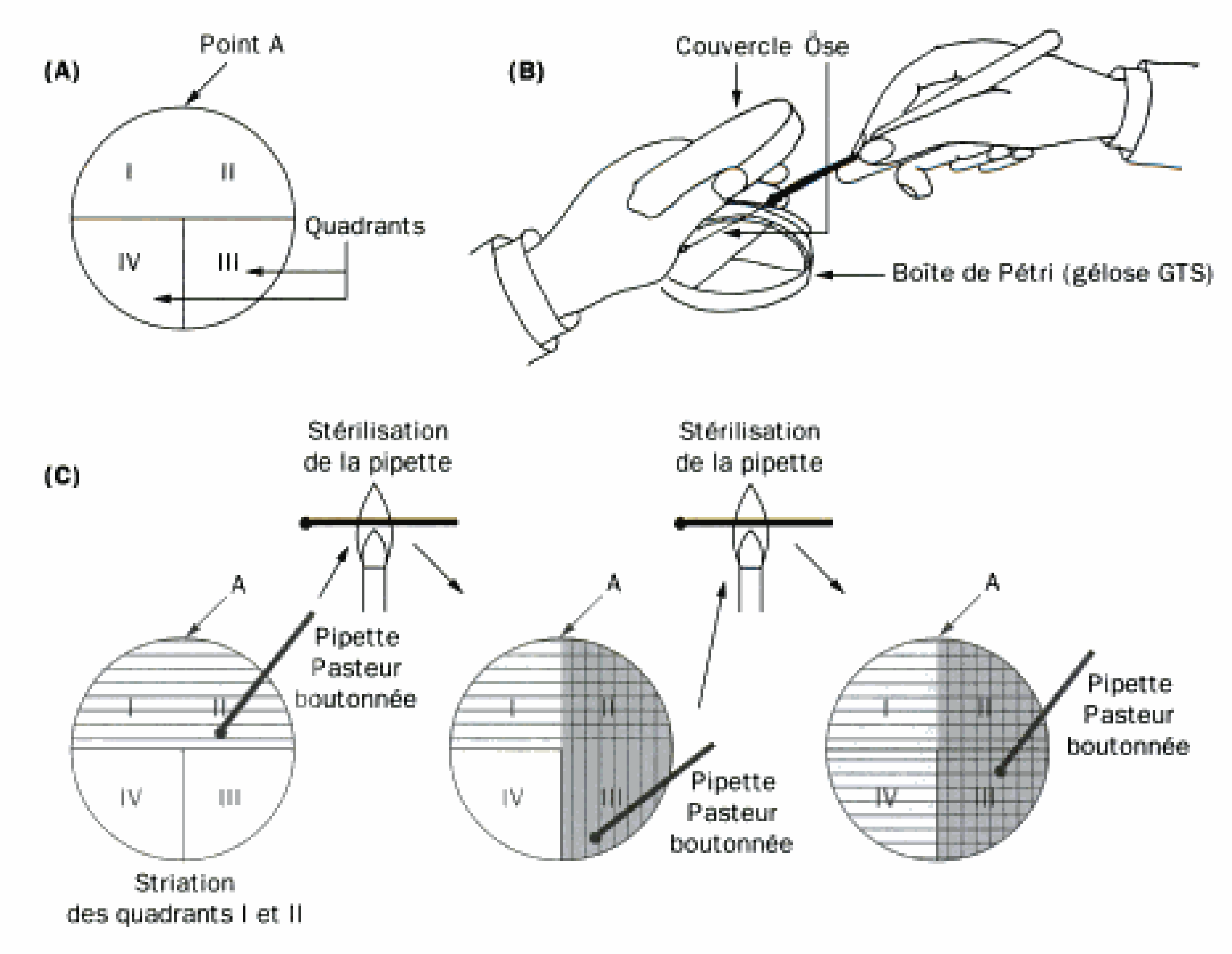


Figure 12.7. Isolement sur boîte de Pétri.
(A) Schéma de l'isolement par la méthode des quadrants.
(B) Dépôt d'une anse d'eau distillée.
(C) Isolement par la méthode des quadrants.

De la main droite, saisir une pipette boutonnée, la stériliser par 2 ou 3 passages rapides dans la flamme.
Placer le bouton de la pipette refroidie au point A, point où le dépôt de l'échantillon à isoler a été effectué. Strier les 2 premiers quadrants (I et II), sans labourer la gélose. Stériliser à nouveau la pipette par 2 où 3 passages rapides dans la flamme, puis strier les quadrants II et III. Stériliser une fois encore la pipette par 2 où 3 passages rapides dans la flamme et strier les quadrants III et IV *(fig. 12.7C)*.
Jeter la pipette dans le bac à eau de Javel.
Incuber la boîte de Pétri retournée à l'étuve pendant 24 heures à 37 °C (il est nécessaire de retourner les boîtes de façon que l'eau de condensation ne se dépose pas à la surface de la gélose).

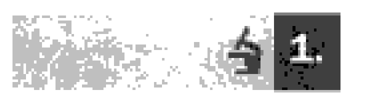
Résultats, observations et interprétation

L'absence totale de colonies sur la gélose indique une manipulation exécutée dans des conditions correctes d'asepsie.



Observations à l'état frais et colorations simples

Sommaire



1. Confection d'un frottis de yaourt et coloration au bleu de méthylène

Mots clés

Flore bactérienne du yaourt, réalisation d'un frottis, coloration au bleu de méthylène.

Principe

La coloration au bleu de méthylène est une coloration simple qui se pratique couramment dans l'industrie laitière. Elle permet d'observer la richesse microbiologique de l'échantillon, la forme et le mode de groupement des bactéries *(fig. 13.1)*.

Sécurité

Se reporter aux consignes de sécurité générales décrites au chapitre 12.

FORMES

Coques

Régulier sphérique

A faces aplaties

A faces concaves

Coccobacille

Forme intermédiaire entre coque et bacille

Bacilles

Bouts carrés

Bouts ronds

Bouts effilés

En massue

En haltère

Vibrions

En virgule

Spiralées

Spirochètes

MODES DE GROUPEMENT

Coques

Isolé

Diplocoque

Chaînette

Grappe ou amas

Bacilles

Isolé

Diplobacille

Chaînette

Paquets d'épingles

Palissade

Figure 13.1. Formes et modes de groupement des bactéries.

Matière d'œuvre

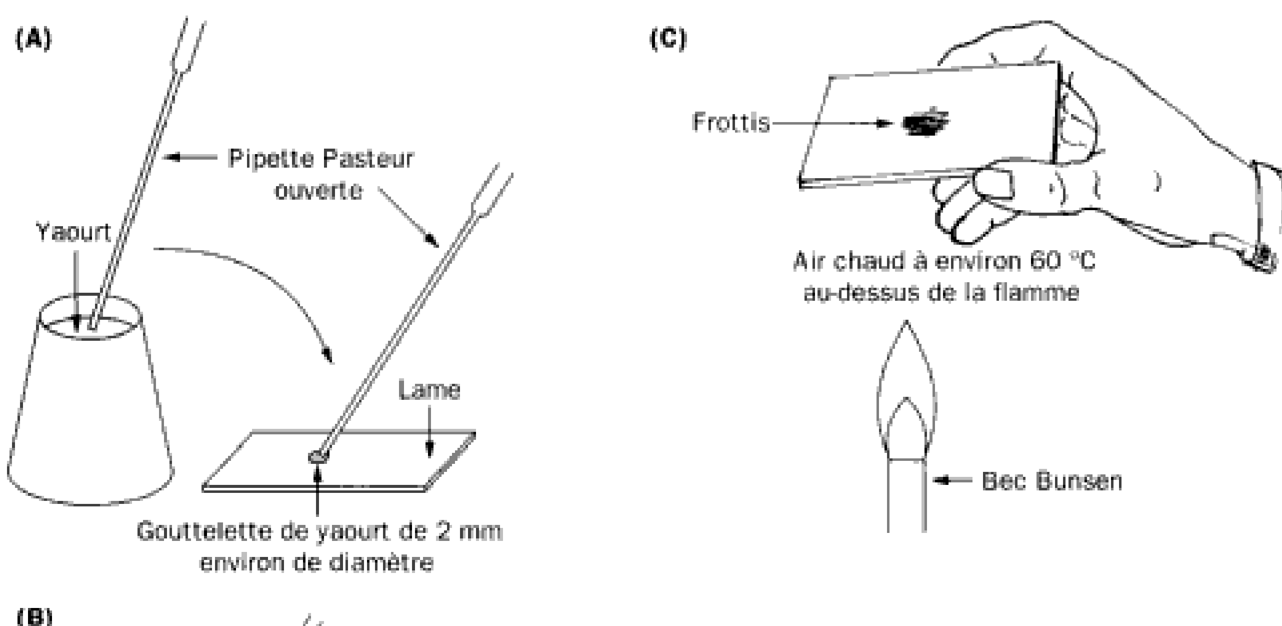
■ ***Matériel biologique***
Un yaourt (ne pas utiliser une préparation lactée au bifidus).

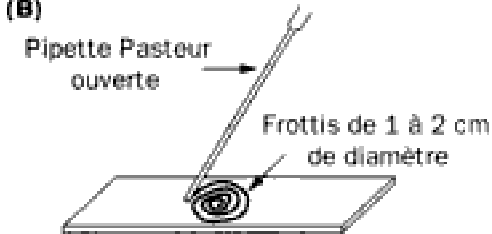
■ ***Réactifs***
– Solution de bleu de méthylène à 2 %.
– Alcool à 90 volumes.
– Huile à immersion.

■ ***Matériel***
– Un bac à coloration.
– Une lame.
– Une pipette Pasteur.
– Un microscope.

Mode opératoire

Déposer, à l'aide d'une pipette Pasteur, au centre d'une lame propre et sèche une gouttelette de yaourt de 2 mm de diamètre *(fig. 13.2A)*. Etaler ce prélèvement en faisant des cercles concentriques, en un film régulier, le plus mince possible *(fig. 13.2B)*. Laisser sécher le frottis à température ambiante ou à une température inférieure à 60 °C (utiliser l'air chaud très au-dessus de la flamme, ne pas surchauffer le frottis) *(fig. 13.2C)*. Recouvrir le frottis sec d'alcool à 90 volumes, laisser agir 2 minutes. Jeter l'excès





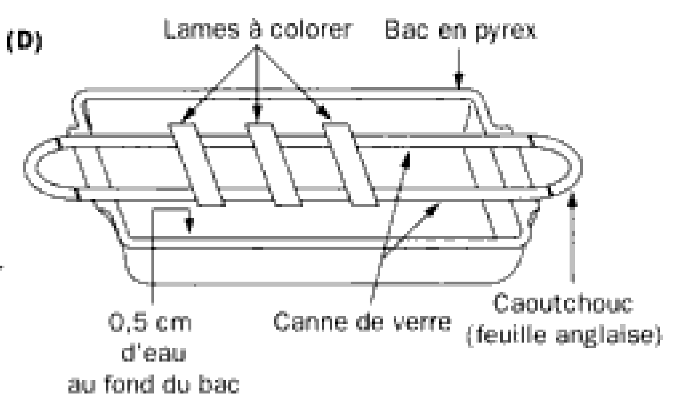
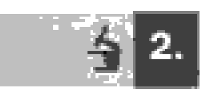


Figure 13.2. Réalisation d'un frottis de yaourt.
(A) Dépôt d'une gouttelette de yaourt.
(B) Réalisation du frottis.
(C) Séchage du frottis.
(D) Réalisation de la coloration.

d'alcool, laisser sécher. Cette partie de la manipulation est exécutée sur un bac à coloration *(fig. 13.2D)*.
Verser sur le frottis fixé une solution de bleu de méthylène à 2 %, laisser agir 30 secondes. Laver d'un jet de pissette. Laisser sécher, ou sécher avec un morceau de papier filtre sans rayer le frottis.
Observer à l'immersion : pour cela mettre une goutte d'huile à immersion sur le frottis coloré et utiliser l'objectif X100 à immersion.

Résultats, observations et interprétation

Noter la forme et le mode de groupement des bactéries qui se répartissent en 2 espèces : l'une en bâtonnet, c'est un lactobacille *(Lactobacillus bulgaricus)* et l'autre arrondie, c'est un streptocoque *(Streptococcus thermophilus)*.



2. Observation à l'état frais et coloration au bleu de méthylène du bacille subtil *(Bacillus subtilis)*

Le matériel biologique utilisé pour cette expérience est constitué par des spores de *Bacillus subtilis* qui sont commercialisées en pharmacie sous le nom de « Bactisubtil ».

Mots clés

Bacille subtil, observation à l'état frais, mobilité, morphologie, coloration au bleu de méthylène.

Principe

La coloration au bleu de méthylène est une coloration simple qui permet d'observer la richesse microbiologique de l'échantillon, la forme et le mode de groupement des bactéries (voir *fig. 13.1*). L'observation à l'état frais, en revanche, permet l'observation des bactéries vivantes et renseigne sur leur mobilité.

Une bactérie est mobile si elle se déplace dans le champ microscopique par un mouvement qui lui est propre. Il est important de ne pas confondre mobilité microbienne et courant liquidien. Les bactéries sont considérées comme mobiles si leurs trajectoires sont aléatoires, pouvant se croiser ; en revanche, si toutes les bactéries se dirigent dans la même direction et dans le même sens, il est impossible de conclure à une quelconque mobilité.

Selon les modalités de la mobilité bactérienne, on peut en tirer des conclusions sur le type de ciliature. Une trajectoire en zigzag, avec une bactérie qui pirouette et qui change brutalement de direction, est le signe d'une ciliature péritriche ; une trajectoire rectiligne avec une très légère ondulation est le signe d'une ciliature polaire *(fig. 13.3)*.

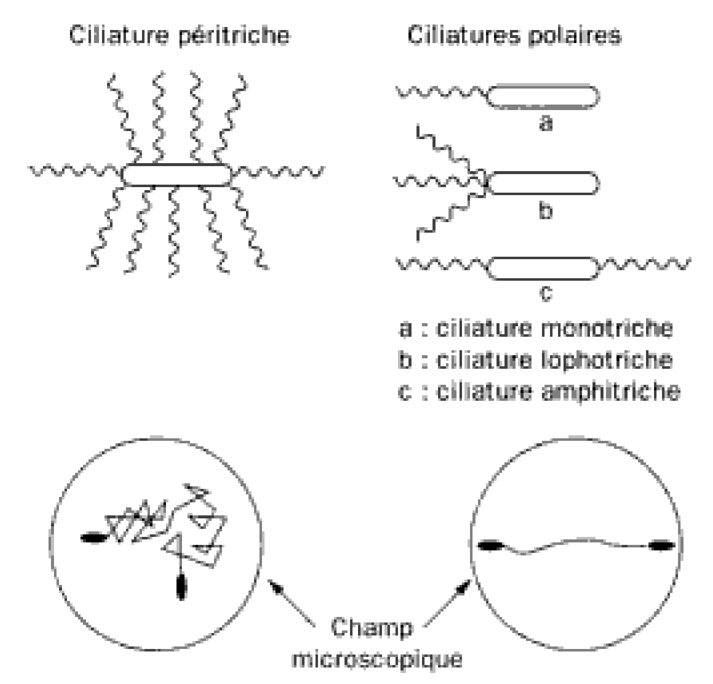


Figure 13.3. Mobilité et ciliatures des bactéries.

Sécurité

Se reporter aux consignes de sécurité générales décrites au chapitre 12.

Matière d'œuvre

■ *Matériel biologique*

Mise en culture la veille de l'expérience (jour J–1) : ouvrir stérilement une gélule de « Bactisubtil ». Prélever une öse de spores que l'on transférera stérilement dans un tube de bouillon ordinaire. Incuber 24 heures à 37 °C.

■ ***Réactifs***

– Solution de bleu de méthylène à 2 %.
– Alcool à 90 volumes.
– Huile à immersion.

■ ***Matériel***

– Un bac à coloration.
– Une lame.
– Une pipette Pasteur.
– Un microscope.
– Une pince brucelles.

Mode opératoire

■ ***Observation à l'état frais***

Déposer au centre d'une lame propre et sèche une goutte de bouillon de culture ensemencé de la veille avec des spores de *Bacillus subtilis (fig. 13.4A)*.
Recouvrir d'une lamelle couvre-objet *(fig. 13.4B)* ; le liquide doit être bien réparti sous la lamelle, sans débordement. Si la préparation se dessèche au cours de l'observation on peut ajouter une gouttelette d'eau en la déposant au bord de la lamelle.
Observer au grossissement 400 ou 500 (oculaire de X10, objectif de 40 ou 50).
Si des courants liquidiens empêchent l'observation, luter la préparation. Pour cela chauffer à la flamme le fer à luter et le déposer à la surface de la paraffine. Répéter cette opé-

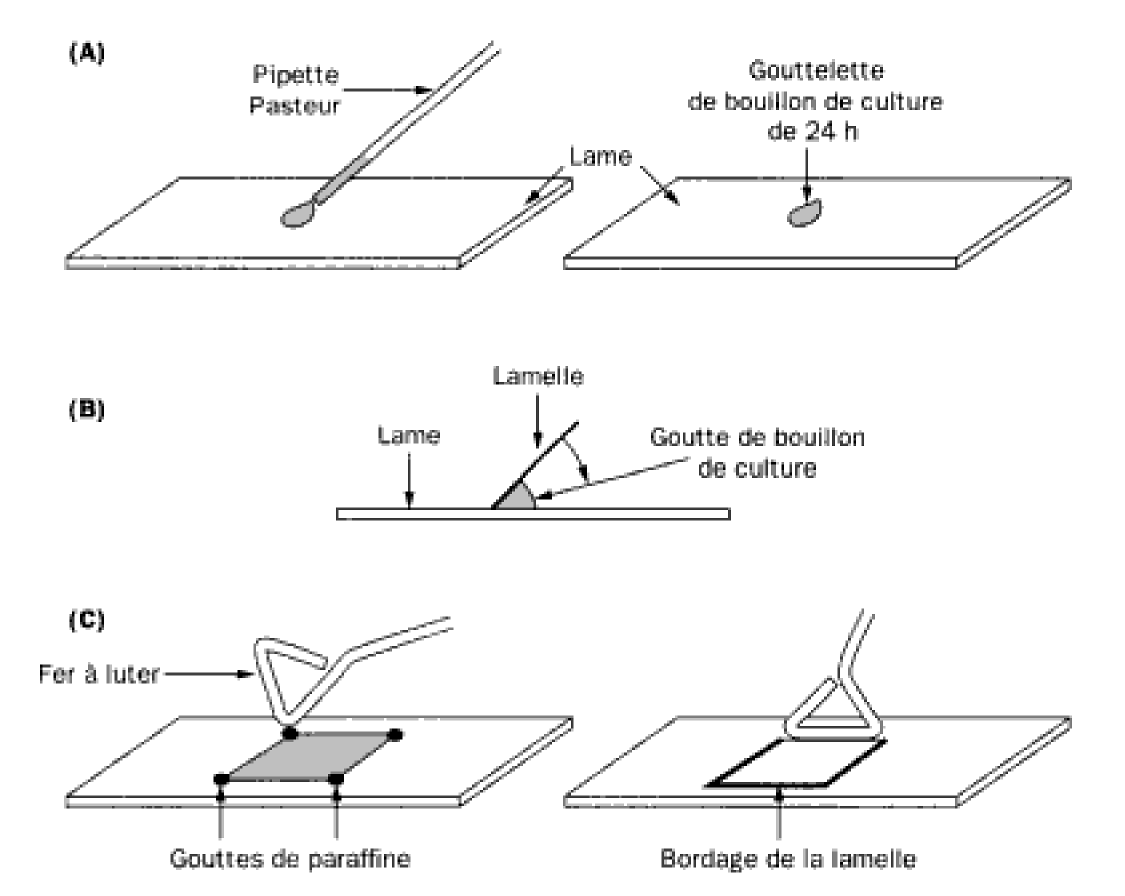


Figure 13.4. Observation à l'état frais.
(A) Dépôt d'une goutte de bouillon de culture de 24 heures.
(B) Pose de la lamelle.
(C) Lutage de la lamelle à la paraffine.

ration à plusieurs reprises de façon à avoir une petite réserve de paraffine fondue (le fer à luter ne doit pas être trop chaud, la paraffine ne doit pas grésiller).
Déposer aux 4 coins de la lamelle une gouttelette de paraffine fondue *(fig. 13.4C)* puis, à l'aide du fer chaud, border la lamelle en faisant fondre les gouttes de paraffine déposées aux 4 coins de la lamelle, qui doit être entourée d'un film continu de 2 mm environ de large.

Résultats, observations et interprétation

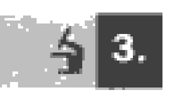
– *Bacillus subtilis* est-elle une bactérie mobile ou immobile ?
– Le cas échéant, quel est le type de ciliature ?

■ ***Réalisation d'un frottis bactérien et coloration au bleu de méthylène***

Déposer au centre d'une lame propre et sèche une gouttelette de bouillon ensemencé depuis 24 heures avec *Bacillus subtilis* de 2 à 3 mm de diamètre, à la pipette Pasteur. Etaler ce prélèvement en faisant des cercles concentriques, en un film régulier, le plus mince possible sur 1 à 2 cm^2 de surface. Laisser sécher le frottis à température ambiante ou à une température inférieure à 60 °C (utiliser l'air chaud très au-dessus de la flamme, ne pas surchauffer le frottis). Recouvrir le frottis sec d'alcool à 90 volumes, laisser agir 30 secondes. Jeter l'excès d'alcool et enflammer l'alcool résiduel. Cette partie de la manipulation est exécutée sur un bac à coloration.
Verser sur le frottis fixé une solution de bleu de méthylène à 2 %, laisser agir 30 secondes.
Laver d'un jet de pissette. Laisser sécher, ou sécher avec un morceau de papier filtre sans rayer le frottis.
Observer à l'immersion : pour cela mettre une goutte d'huile à immersion sur le frottis coloré et utiliser l'objectif X100 à immersion.

Résultats, observations et interprétation

Décrire la forme des bacilles et leur mode de groupement.



3. Observation de la levure de bière *(Saccharomyces cerevisiae)*

Mots clés

Levure, cellules eucaryotes, bourgeonnement.

Principe

La levure de bière ou levure de boulanger est une cellule eucaryote. Son observation à l'état frais en utilisant un colorant qui améliore le contraste, le bleu coton, permet l'observation des noyaux.

La reproduction végétative de la cellule se fait par bourgeonnement (voir VI.32.4).

Sécurité

Se reporter aux consignes de sécurité générales décrites au chapitre 12.

Matière d'œuvre

Matériel biologique

Un peu de levure de boulanger.

Réactifs

– Solution de bleu coton.
– Solution de glucose à 100 g/L.

Matériel

– Un bac à coloration.
– Une lame.
– Une pipette Pasteur.
– Une öse.
– Un microscope.
– Une pince brucelles.

Mode opératoire

Dans un tube à hémolyse, verser 10 gouttes d'eau distillée. Y ajouter une très petite pointe de scalpel de levure de boulanger et 2 gouttes de bleu coton. Mélanger soigneusement et prélever, avec une pipette Pasteur, une gouttelette du mélange. Recouvrir d'une lamelle porte-objet. Observer au grossissement moyen (objectif X40 ou X60).

Résultats, observations et interprétation

On voit des cellules ovalaires de 6 à 8 µm de long, immobiles, nucléées, dont certaines sont bourgeonnantes *(fig. 13.5)*.

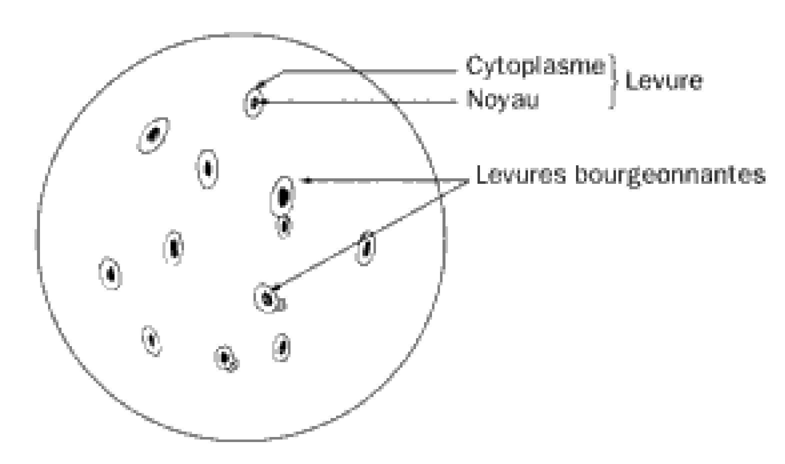


Figure 13.5. Représentation d'un champ microscopique d'une préparation de levure de bière.



La coloration de Gram

Sommaire

Page

La coloration de Gram

Principe

La coloration de Gram*, sur laquelle est fondée la taxonomie bactérienne, rend compte de la différence de composition chimique de la paroi de deux groupes de bactéries (les bactéries Gram + et les bactéries Gram –).

La paroi est l'enveloppe rigide que possèdent toutes les bactéries (à l'exception des rares espèces qui en sont dépourvues : les mycoplasmes).

Le principe de la coloration de Gram consiste à soumettre un frottis bactérien séché et fixé à l'action d'un colorant primaire violet (violet de gentiane dans le cas de la coloration de Gram classique ou violet cristal pour la coloration de Gram standard dite Gram américain) puis à un mordançage au lugol (solution iodo-iodurée). A ce stade le cytoplasme de toutes les bactéries est coloré en violet.

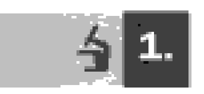
L'étape suivante, la plus délicate, est la différenciation à l'alcool. Elle consiste à soumettre les bactéries ayant subi la coloration primaire violette à l'action contrôlée de l'éthanol. Certaines bactéries dont la paroi est imperméable à l'alcool dans les conditions opératoires de la coloration restent colorées en violet : elles sont Gram positif. D'autres, dont la paroi est perméable à l'alcool dans les mêmes conditions, sont décolorées : elles sont Gram négatif.

A l'issue de l'étape de différenciation, les bactéries Gram positif sont colorées en violet, les bactéries Gram négatif sont incolores.

La dernière étape est la coloration secondaire dite aussi coloration de contraste qui consiste à soumettre le frottis à un colorant rose (fuchsine pour le Gram classique, safranine pour le Gram standard) *(tab. 14.I)*.

Outre le caractère Gram + ou –, cette coloration renseigne également sur la morphologie bactérienne et sur le mode de groupement des bactéries (avec quelques réserves car la réalisation du frottis peut abîmer certains modes de groupements caractéristiques mais fragiles).

* Coloration inventée par Gram, médecin biologiste, en 1884.



1. Confection d'un frottis de yaourt et coloration de Gram

Mots clés

Bactéries du yaourt, coloration de Gram, réalisation d'un frottis.

Sécurité

Se reporter aux consignes de sécurité générales décrites au chapitre 12.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***
Un yaourt (ne pas utiliser une préparation lactée au bifidus).

■ ***Réactifs***
– Solution de bleu de violet cristallisé (commercialisée prête à l'emploi).
– Solution de safranine (commercialisée prête à l'emploi).
– Alcool à 90 volumes.
– Lugol :

– iode	4 g
– iodure de potassium	8 g
– eau distillée qsp	1 L

– Huile à immersion.

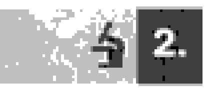
■ ***Matériel***
– Un bac à coloration.
– Une pince en acier inoxydable à bouts ronds.
– Une lame.
– Une pipette Pasteur.
– Un microscope.
– Une pissette d'eau.

Mode opératoire

Déposer au centre d'une lame propre et sèche une gouttelette de yaourt de 2 mm de diamètre, à la pipette Pasteur. Etaler ce prélèvement en faisant des cercles concentriques, en un film régulier, le plus mince possible. Laisser sécher le frottis à température ambiante ou à une température inférieure à 60 °C (utiliser l'air chaud très au-dessus de la flamme, ne pas surchauffer le frottis). Placer la lame sur un bac à coloration.
La coloration de Gram la plus facile à réaliser est celle du Gram standard. Suivre exactement le mode opératoire du Gram standard décrit dans le *tableau 14.I*.
La coloration terminée, observer la préparation avec l'objectif X100 à immersion.
On retrouve les morphologies des bactéries décrites lors de l'observation après la coloration simple au bleu de méthylène :
– des bacilles longs et fins : il s'agit de *Lactobacillus bulgaricus* ;
– des bactéries rondes correspondant à *Streptococcus thermophilus*.
Les deux espèces sont colorées en violet, elles sont toutes deux Gram positif.

Tableau 14.I La coloration de Gram.

	Gram classique	Gram standard (dit Gram américain)
Fixation	Recouvrir le frottis sec d'alcool à 90 volumes, laisser agir 30 secondes. Jeter l'excès d'alcool. Enflammer l'alcool résiduel.	Recouvrir le frottis sec d'alcool à 90 volumes, laisser agir 30 secondes. Jeter l'excès d'alcool. Enflammer l'alcool résiduel.
Coloration primaire	Coloration au violet de gentiane : filtrer quelques cm^3 de violet de gentiane. Recouvrir la lame de 20 gouttes de violet filtré en le versant à une extrémité de la lame. Laisser agir 20 secondes exactement.	Coloration au violet cristallisé : recouvrir la lame de violet cristallisé. Laisser agir 1 minute très exactement. Laver à l'eau.
Mordançage	Rejeter le violet en l'entraînant avec la solution de lugol par 3 fois. La lame ne doit jamais rester découverte. Le temps de mordançage total doit être égal ou légèrement supérieur au temps de violet.	Recouvrir la lame de lugol. Laisser agir 1 minute très exactement. Laver à l'eau.
Différenciation	Décoloration à l'alcool : rincer la pince à l'alcool, puis rincer l'envers de la lame à l'alcool, puis à l'eau. Laver le frottis à l'alcool jusqu'à ce que l'alcool qui en tombe s'écoule incolore. Rincer à l'eau immédiatement pour stopper la décoloration. Vérifier la décoloration en versant quelques gouttes d'alcool. Laver à l'eau.	Décoloration à l'alcool : recouvrir la lame d'alcool. Laisser agir 30 secondes très exactement. Laver à l'eau.
Coloration de contraste	Recouvrir la lame d'eau. Verser quelques gouttes de fuchsine à chaque extrémité (dilution du colorant). Laisser agir 10 à 20 secondes. Rincer à l'eau. Sécher au papier absorbant.	Recouvrir la lame de safranine. Laisser agir 1 minute très exactement. Laver à l'eau. Sécher au papier absorbant.



2. Coloration de Gram réalisée sur un frottis d'*Acetobacter aceti*

Cette bactérie est choisie pour son caractère non pathogène. La souche est disponible au souchier de l'Institut Pasteur.
Sa mise en culture est à faire au laboratoire de préparation 10 jours avant l'expérience.
Composition du milieu permettant la culture d'*Acetobacter aceti* :

– Agar	15 g
– Autolysat de levure	10 g
– $CaCO_3$	10 g
– Glucose	3 g
– Eau distillée qsp	1 litre

– pH 7,0 ± 0,2.

Mélanger les constituants. Ajuster le pH. Homogénéiser énergiquement. Chauffer et amener à ébullition. Répartir en tubes, autoclaver 15 minutes à 121 °C. Agiter fortement et refroidir rapidement en pente de façon à maintenir le carbonate de calcium en suspension.
Ensemencer le milieu en striant la pente avec une suspension d'*Acetobacter aceti*. Incuber 8 à 10 jours à 30 °C.

Mots clés

Bactérie du vinaigre, coloration de Gram, bactérie Gram négatif.

Sécurité

Se reporter aux consignes de sécurité générales décrites au chapitre 12.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

Un tube de milieu gélosé en pente ensemencé avec *Acetobacter aceti*.

■ ***Réactifs***

– Solution de bleu de violet cristallisé (commercialisée prête à l'emploi).
– Solution de safranine (commercialisée prête à l'emploi).
– Alcool à 90 volumes.
– Lugol :

– I_2	4 g
– KI	8 g
– eau distillée qsp	1 L

– Huile à immersion.

■ ***Matériel***

– Un bac à coloration.
– Une lame.
– Une pipette Pasteur.
– Une ōse.
– Un tube d'eau distillée stérile.
– Un tube à hémolyse stérile.
– Un microscope.

Mode opératoire

Prélever à l'öse une colonie sur la pente de la gélose que l'on dissociera dans 10 gouttes d'eau distillée stérile contenues dans un tube à hémolyse. Homogénéiser soigneusement la suspension ainsi réalisée qui doit être trouble. Si ce n'était pas le cas prélever une deuxième colonie et la dissocier dans la suspension *(fig. 14.1)*.
Etaler en frottis une gouttelette de cette suspension. Sécher.
Pratiquer la coloration de Gram selon le protocole du Gram standard *(tab. 14.I)*.

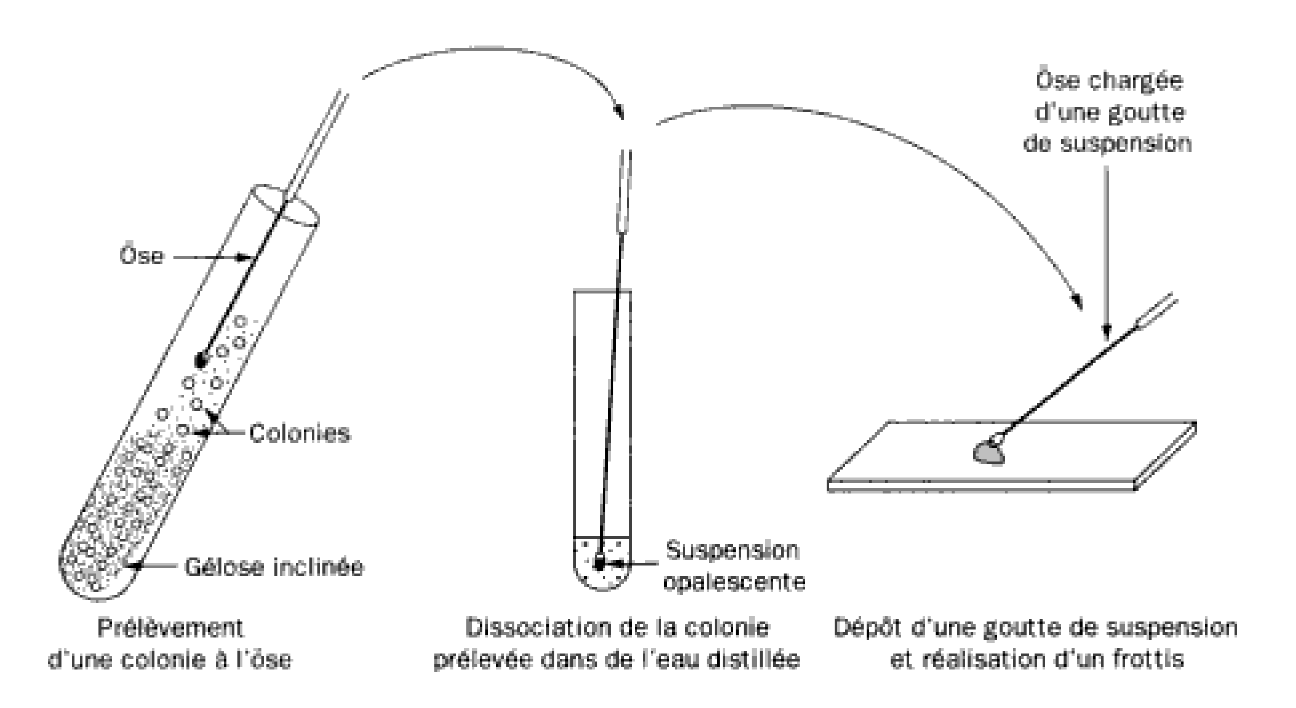


Figure 14.1. Réalisation d'une suspension bactérienne à partir d'une colonie sur gélose.

Résultats, observations et interprétation

Les bactéries apparaissent roses, elles sont Gram négatif.



Culture des bactéries

Sommaire

Page



1. Ensemencement d'un bouillon ordinaire

Mots clés

Culture du bacille subtil, bouillon ordinaire.

Principe

Cette expérience consiste à faire pousser le bacille subtil sur bouillon ordinaire. La souche dont on part est le bacille commercialisé sous forme de spores, en pharmacie, sous le nom de « Bactisubtil ».

Sécurité

Se reporter aux consignes de sécurité générales décrites au chapitre 12.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

Une capsule de Bactisubtil.

■ ***Réactifs et milieux***

– Un tube de bouillon ordinaire.
– Solution de bleu de violet cristallisé (commercialisée prête à l'emploi).
– Solution de safranine (commercialisée prête à l'emploi).
– Alcool à 90 volumes.
– Lugol :
  – I_2 4 g
  – KI 8 g
  – eau distillée qsp 1 L
– Huile à immersion.

■ ***Matériel***

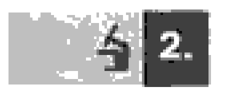
– Une öse.
– Un bac à coloration.
– Une lame.
– Une pipette Pasteur.
– Un microscope.
– Une étuve réglée à 37 °C.

Mode opératoire

Dans les conditions habituelles de travail stérile, ouvrir délicatement une capsule de Bactisubtil. Y plonger une öse stérile et refroidie. Après l'avoir chargée de spores, ensemencer un tube de bouillon ordinaire.
Incuber 24 heures à 37 °C.
Observer le trouble du milieu : un trouble localisé à la surface indique une bactérie au métabolisme aérobie strict ; un trouble homogène indique un métabolisme respiratoire aéro-anaérobie.
Effectuer une coloration de Gram sur le bouillon ensemencé.

Résultats, observations et interprétation

Vérifier la pureté de la culture. La présence d'une seule espèce de bactéries, bacilles Gram +, rectilignes, à bouts carrés, est l'indication d'une expérience exécutée dans des conditions d'asepsie convenables.



2. Isolement de la culture précédente sur gélose trypticase-soja

Mots clés

Isolement sur milieu solide, pureté d'une culture bactérienne, colonies, clones.

Principe

Cette expérience a pour but de vérifier la pureté de la culture en milieu liquide obtenue dans l'expérience précédente. L'isolement consiste à disséminer la prise d'essai de l'échantillon à isoler à la surface d'un milieu solide, jusqu'à obtenir des bactéries isolées. Incubées 24 heures à 24 °C, les bactéries développent des colonies ou clones. Si l'aspect macroscopique des colonies est le même pour toutes, la probabilité de la pureté de la culture en bouillon est très grande.

Sécurité

Se reporter aux consignes de sécurité générales décrites au chapitre 12.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

Bouillon ensemencé du *Bacillus subtilis.*

■ ***Réactifs et milieux***

Une boîte de Pétri de milieu gélosé trypticase-soja (ce milieu est commercialisé prêt à l'emploi).

■ ***Matériel***

– Une pipette Pasteur.
– Une öse.
– Une étuve réglée à 37 °C.

Mode opératoire

Le mode opératoire de l'isolement sur gélose boîte, par la méthode des quadrants, a été décrit à la *figure 12.7.*

Charger une öse de bouillon ensemencé du *Bacillus subtilis.* Déposer la goutte au point A d'une boîte de Pétri de gélose trypticase-soja, sèche, sur l'envers de laquelle ont été tracés les traits délimitant les quadrants *(fig. 12.7A).*

A l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, stérile, en partant du point A, strier les quadrants I et II. Stériliser la pipette par 2 ou 3 passages rapides dans la flamme, puis strier les quadrants II et III. Stériliser à nouveau la pipette par 2 ou 3 passages rapides dans la flamme et strier les quadrants III et IV.

Incuber la boîte retournée 24 heures à 37 °C.

L'isolement est réussi si l'on obtient des colonies isolées dans le quadrant IV.

Résultats, observations et interprétation

La culture sur bouillon est pure si l'on obtient un seul type de colonie.

Les colonies de *Bacillus subtilis* sont généralement assez grandes, plates, opaques, à surface chiffonnée et à bords dentelés.



Analyse nutritionnelle de la levure de bière : *Saccharomyces cerevisiae*. Auxanogramme des sucres

Analyse nutritionnelle de la levure de bière

Le matériel biologique utilisé pour cette expérience est la levure de bière retenue pour son absence de pathogénicité. La levure est présentée isolée sur une gélose de Sabouraud + chloramphénicol. (Le chloramphénicol sert à éliminer les bactéries saprophytes.)

Mots clés

Source de carbone, levure de bière.

Principe

La technique de l'auxanogramme du carbone est habituellement utilisée comme méthode biochimique d'identification des levures.

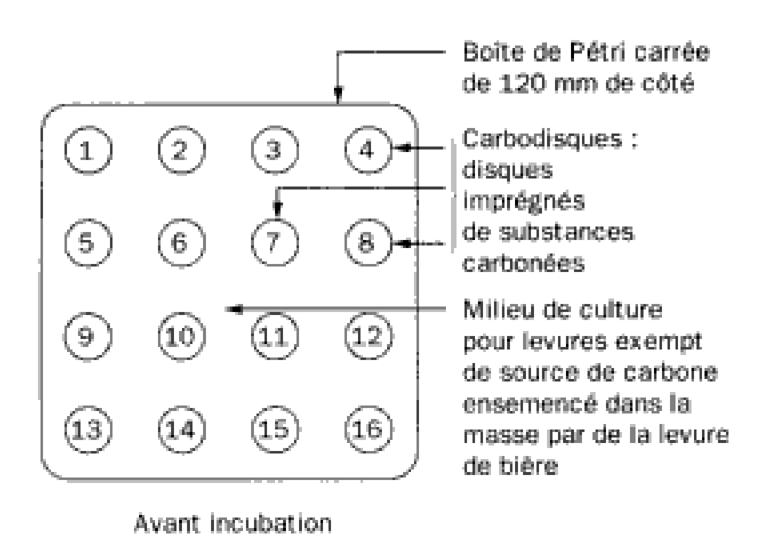
L'expérience réalisée utilise cette technique afin de déterminer, parmi 16 sources de carbone, celles qui sont utilisables par la levure de bière *(Saccharomyces cerevisiae)*.

On ensemence dans la masse un milieu de base par la souche pure de *Saccharomyces cerevisiae*. Ce milieu contient tous les facteurs permettant la culture de la levure, à l'exclusion de la source de carbone.

Le milieu ensemencé est coulé dans une boîte de Pétri carrée stérile, de 12 cm de côté.

Après refroidissement, on dépose stérilement à la surface du milieu gélosé les 16 carbodisques, disques de papier stérile imprégnés de solution de sources de carbone : glucose, maltose, saccharose, D(+) galactose, lactose, raffinose, inositol, cellobiose, D(+) xylose, tréhalose, L(–) arabinose, adonitol, 2-céto-glutarate, méthyl-2-glucoside, mélézitose, N-acétyl glucosamine.

Après une incubation de 48 heures à 30 °C, la présence de culture autour du disque indique que la source de carbone est utilisée par la levure *(fig. 16.1)*.



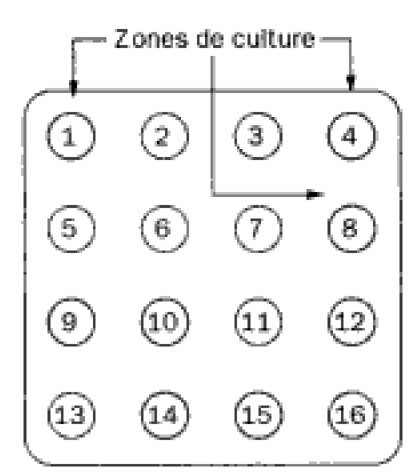


Figure 16.1. Auxanogramme de 16 sources de carbone.

Sécurité

Se reporter aux consignes de sécurité générales décrites au chapitre 12.
La manipulation de la gélose fondue est dangereuse, les brûlures causées par la gélose chaude sont graves.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***
Ensemencer par isolement (méthode des quadrants) une gélose de Sabouraud + chloramphénicol coulée en boîte de Pétri, 2 jours avant l'expérience. Utiliser une souche purifiée sur gélose Sabouraud + chloramphénicol de levure de boulanger ou la souche commercialisée par l'institut Pasteur. Incuber 48 heures à 30 °C. (La gélose de Sabouraud + chloramphénicol est commercialisée prête à l'emploi.)

■ ***Réactifs et milieux***
- Seize carbodisques différents contenant 16 substances carbonées (les carbodisques sont commercialisés prêts à l'emploi).
- Un flacon de 25 cm^3 de milieu pour auxanogramme des champignons lévuliformes (milieu commercialisé prêt à l'emploi).
- Un tube d'eau distillée.

■ ***Matériel***
- Une öse.
- Une pipette Pasteur.
- Une boîte de Pétri carrée stérile de 12 cm de côté.
- Un tube à essais stérile.
- Un bain-marie bouillant.
- Un bain thermostaté réglé à 44 °C.
- Une étuve réglée à 30 °C.

Mode opératoire

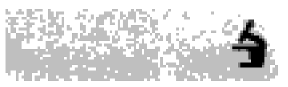
Faire fondre le milieu gélosé de base au bain-marie bouillant, puis le maintenir en surfusion en le plaçant au bain thermostaté à 44 °C.
Pendant ce temps, transférer 20 gouttes d'eau distillée stérile dans un tube stérile. Y introduire 2 anses de culture prélevée sur le milieu d'isolement (Sabouraud + chloramphénicol). Agiter la suspension qui doit présenter une turbidité appréciable à l'œil. Si tel n'était pas le cas ajouter une anse supplémentaire de culture. Agiter à nouveau afin d'obtenir une suspension homogène, puis l'incorporer dans la gélose en surfusion. Homogénéiser par agitation et couler rapidement en boîte de Pétri carrée stérile. Laisser refroidir.
Disposer stérilement à la surface de la gélose les 16 carbodisques comme il est indiqué sur la *figure 16.1*.
Incuber 48 heures à 30 °C.

Résultats, observations et interprétation

Observer la présence ou l'absence de culture autour des disques. La présence d'une culture visible autour d'un disque est l'indication que la source de carbone dont le disque est imprégné est utilisée, en aérobiose, par la levure.



Détermination du type respiratoire de *Bacillus subtilis*



4 Détermination du type respiratoire de *Bacillus subtilis*

Mots clés

Type respiratoire, gélose VF, respiration, fermentation.

Principe

La plupart des bactéries sont chimio-organotrophes, cela signifie qu'elles produisent l'énergie nécessaire à leur vie en oxydant les substrats organiques énergétiques du milieu qu'elles sont capables de cataboliser.
Cette énergie leur sert à assurer les principales fonctions liées à la vie de la cellule, la synthèse de matériel cellulaire et la lutte contre les forces osmotiques de façon à maintenir l'intégrité de la composition cellulaire et à se déplacer.
Selon la nature de l'accepteur final d'électrons, on distingue les bactéries qui respirent de celles qui fermentent.
Elles respirent lorsque l'accepteur final d'électrons est minéral (O_2, NO_3^-, SO_4^{2-}).
Elles fermentent lorsque l'accepteur final d'électrons est organique et endogène, par exemple : fermentation lactique chez les lactobacilles.
Le comportement des bactéries à l'égard de l'oxygène se définit par le type respiratoire.
Si la bactérie ne peut vivre qu'en présence d'oxygène, elle est aérobie stricte. Si elle ne peut vivre qu'en l'absence d'oxygène, elle est anaérobie stricte. Si elle respire en présence d'oxygène et fermente en son absence, elle est aéro-anaérobie facultative.
Afin de déterminer le comportement d'une bactérie à l'égard de l'oxygène, on utilise un tube de gélose VF (viande-foie) régénérée.
Le milieu est conditionné dans un tube étroit de 18 cm de long et 0,9 cm de diamètre.
Avant son utilisation, il faut le régénérer en le plaçant 30 minutes dans un bain-marie bouillant, le tube légèrement dévissé.
Veiller à ne pas surchauffer le tube (par manque d'eau dans le bain-marie), il y aurait alors risque d'explosion.
Sous l'effet de la régénération, il s'établit dans le tube un gradient de pouvoir réducteur.
A la surface libre du tube, au contact de l'oxygène de l'air, le milieu est relativement oxydant, les bactéries aérobies pourront y pousser. En revanche, au fond du tube où le milieu est fortement réducteur, seules les anaérobies pousseront.
Une bactérie qui poussera sur toute la hauteur du tube est aéro-anaérobie facultative *(fig. 17.1)*.

Sécurité

Se reporter aux consignes de sécurité générales décrites au chapitre 12.
La régénération de la gélose VF se fait par chauffage à 100 °C, au bain-marie bouillant. Il est impératif de ne pas dépasser cette température sous peine de provoquer une violente explosion. Cela est possible en veillant à la présence permanente d'eau en ébullition dans le bain-marie.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***
Une préculture de *Bacillus subtilis*, dans les conditions habituelles de travail stérile. Ouvrir délicatement une capsule de Bactisubtil. Y plonger une öse stérile et refroidie. Après l'avoir chargée de spores, ensemencer un tube de bouillon ordinaire. L'incuber 24 heures à 37 °C.

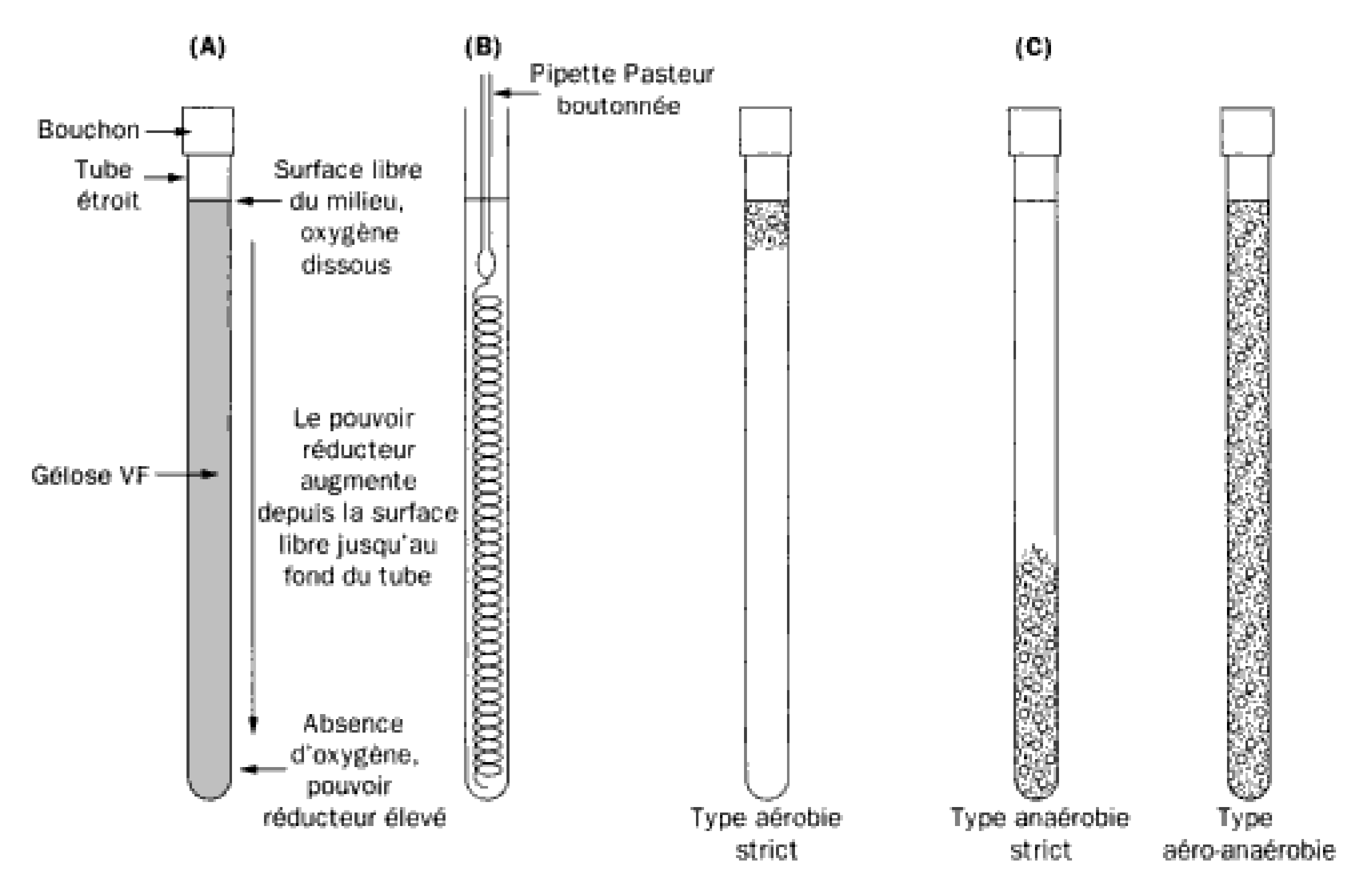


Figure 17.1. La gélose VF.
(A) Le gradient de pouvoir réducteur.
(B) L'ensemencement.
(C) La lecture.

■ ***Milieu***
Un tube de gélose VF (la gélose VF [viande-foie] est commercialisée prête à l'emploi).

■ ***Matériel***
– Une pipette Pasteur.
– Une étuve réglée à 37 °C.

Mode opératoire

Préparer 1 tube de gélose VF. Le régénérer. Le laisser refroidir et le maintenir en surfusion à 45 °C. L'ensemencer avec la culture sur bouillon de *Bacillus subtilis*.
Stériliser une pipette Pasteur scellée par 2 ou 3 passages rapides dans une flamme. La tremper dans le tube de bouillon ensemencé de *Bacillus subtilis*. Puis, introduire l'effilure jusqu'au fond du tube et remonter la pipette en décrivant des tours de spires très serrés. Sortir verticalement à 0,5 cm de la surface *(fig. 17.1)*.
Incuber 24 heures à 37 °C.

Résultats, observations et interprétation

Lire le tube de gélose VF : ce terme signifie « observer dans quelle zone du tube, il y a eu croissance ». Interpréter, c'est-à-dire déduire quel est le type respiratoire de *Bacillus subtilis*.



La multiplication des bactéries

Sommaire

Page

La multiplication des bactéries

Mots clés

Mode de division binaire des bactéries, temps de latence, taux de croissance exponentiel, temps de génération, biomasse ou croissance totale.

Principe

Si l'on ensemence un bouillon riche par une préculture pure de *Bacillus subtilis*, à un pH neutre, à une température constante de 37 °C, les cellules bactériennes se divisent sur un mode binaire : une cellule-mère donne deux cellules-filles, puis chacune des cellules-filles donne à son tour deux cellules-filles, etc. *(fig. 18.1)*. Partant d'une cellule, après n divisions, il apparaît dans le milieu 2^n bactéries. Si au départ, il y a x_0 bactéries, après n divisions, il y a dans le milieu $x = x_0.2^n$ bactéries.

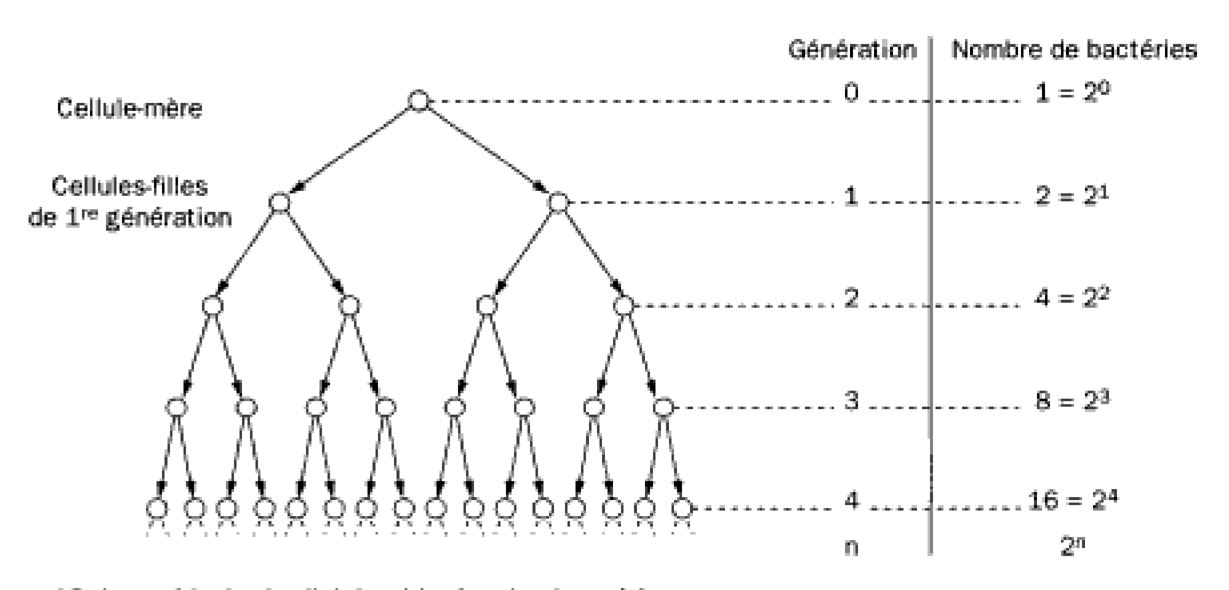


Figure 18.1. Mode de division binaire des bactéries.

On appelle temps de génération (G), le temps nécessaire à la division d'une cellule, c'est aussi le temps nécessaire au doublement du nombre ou de la masse des cellules.
Si au début les divisions sont synchrones, le temps de génération n'étant pas exactement identique pour toutes les bactéries, la culture devient rapidement asynchrone.
Une grandeur définit précisément la vitesse de multiplication d'une population bactérienne : c'est le taux de croissance exponentiel binaire μ, qui représente le nombre de divisions par unité de temps (généralement on donne μ en h^{-1}). On a μ (en h^{-1}) = 1/G (en h).
La loi de multiplication des bactéries, exprimée en mode binaire s'écrit :

$$x = x_0.2^{\mu t}$$

– x représente le nombre de bactéries au temps t ;
– x_0 le nombre de bactéries au temps zéro ;
– μ le taux de croissance exponentiel binaire ;
– t le temps.

La courbe de croissance peut être représentée sous la forme x = f (t) ou lg x = f (t) *(fig. 18.2)*. On peut distinguer plusieurs phases :
– la phase de latence (A), phase durant laquelle il n'y a aucune croissance (μ = 0) ;
– la phase d'accélération (B), phase au cours de laquelle le taux de croissance (μ) augmente ;

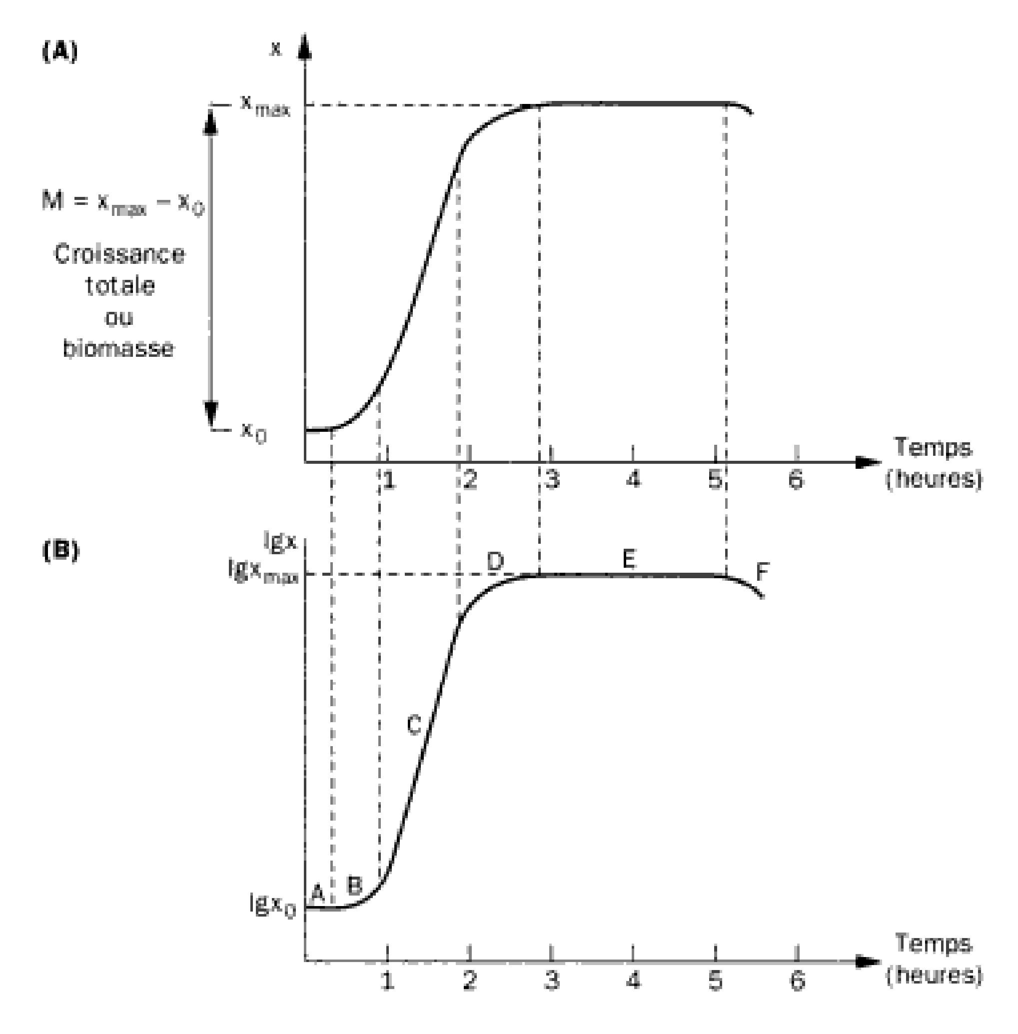


Figure 18.2. Courbes de croissance en milieu liquide non renouvelé.
(A) En coordonnées décimales.
(B) En coordonnées semi-logarithmiques.

– la phase exponentielle de croissance (C) durant laquelle le taux de croissance est maximal et constant (μ_{max} = cte) ;
– la phase de ralentissement (D) qui voit le taux de croissance (μ) diminuer ;
– la phase stationnaire finale, ou phase plateau (E), qui correspond à un arrêt de la croissance ($\mu = 0$) ;
– la phase de déclin (F) au cours de laquelle le nombre de cellules diminue ($\mu < 0$).

■ ***Le temps de latence (L)***

Le temps de latence dépend à la fois de l'état des bactéries de l'inoculum et de la nature du milieu de culture.

Le temps de latence est long si les bactéries de l'inoculum sont en état de souffrance, par exemple lorsque les bactéries de l'inoculum ont été recueillies en phase plateau, dans un milieu épuisé. Les bactéries sont altérées, le temps de latence correspond au temps nécessaire à la reconstitution de leur potentiel de développement.

Le temps de latence est long si les bactéries de l'inoculum ont été cultivées sur un milieu riche et repiquées sur un milieu minimum ; elles doivent s'adapter à ce nouveau milieu et induire les voies de synthèse des métabolites que le milieu riche leur fournissait préformés.

Il en est de même si les bactéries de l'inoculum ont été cultivées sur un milieu minimum dont la source de carbone et d'énergie est le glucose et repiquées sur un milieu minimum dont la source de carbone et d'énergie est l'arabinose.

■ ***Le taux de croissance exponentiel binaire (µ)***

Pendant la phase exponentielle de croissance, toutes les bactéries se divisent à la même vitesse, l'accroissement de leur nombre ou de leur masse par unité de temps est constant. Le temps de génération (G), qui correspond au temps nécessaire à la bactérie pour se diviser, est l'inverse de µ.

$$\mu = 1/G$$

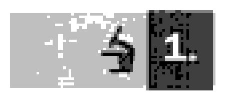
µ est exprimé en h^{-1} et G en h.

Le taux de croissance exponentiel varie avec l'espèce bactérienne, la nature et la concentration de la source de carbone et d'énergie, le pH et la température.

■ ***La biomasse ou croissance totale (M)***

En phase plateau, les bactéries cessent de se multiplier. Cet arrêt de croissance peut avoir plusieurs causes : épuisement du milieu de culture en un nutriment limitant, modification du pH, accumulation d'une substance toxique dans le milieu.

On appelle biomasse ou croissance totale la différence entre la masse bactérienne (ou la densité bactérienne) mesurée au début de la phase plateau et la masse bactérienne (ou la densité bactérienne) mesurée en phase de latence *(fig. 18.2A)*.



Croissance de *Bacillus subtilis* sur milieu liquide riche (bouillon TGY), estimation de la croissance bactérienne par turbidimétrie

Mots clés

Croissance bactérienne, turbidimétrie, gamme de turbidité.

Sécurité

Se reporter aux consignes de sécurité générales décrites au chapitre 12.
Le formol est un composé toxique et corrosif qu'il est interdit de pipeter à la bouche et d'inhaler.

Principe

Estimation de la croissance bactérienne par turbidimétrie : afin d'apprécier de manière semi-quantitative l'augmentation de population bactérienne dans un milieu liquide, on peut estimer visuellement l'intensité du trouble causé par les cellules en le comparant à celui d'une gamme de turbidité.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

Une préculture de *Bacillus subtilis* : dans les conditions habituelles de travail stérile, ouvrir délicatement une capsule de Bactisubtil. Y plonger une öse stérile et refroidie. Après l'avoir chargée de spores, ensemencer un tube de bouillon ordinaire et l'incuber 24 heures à 37 °C.

■ ***Réactifs et milieux***

- Un tube de bouillon TGY (trypticase-glucose-yeast).
- Un flacon de formol (formaldéhyde en solution à 37 %).
- 50 mL de milieu TGY autoclavé stérile et refroidi à 0-4 °C.

■ ***Matériel***

- Une pipette Pasteur.
- Un bain thermostaté réglé à 37 °C, à défaut un grand cristallisoir contenant de l'eau à 37 °C.
- Une série de 7 tubes pour bouillon de culture propres et secs et le matériel pour les obturer.
- Huit pipettes permettant de prélever 8 mL d'un milieu de culture en respectant les bonnes pratiques de sécurité.

Mode opératoire

■ ***Préalable***

Numéroter les 7 tubes propres et secs 1 – 1/2 – 1/4 – 1/8 – 1/16 – 1/32 – 1/64, respectivement.
Introduire 4 gouttes de formol dans le tube 1,8 gouttes dans le tube 1/2 et 4 gouttes dans les tubes 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 et 1/64.
Introduire 8 mL de milieu TGY stérile refroidi à 0-4 °C dans les tubes 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 et 1/64.

■ ***Initiation de la culture***
Le bouillon TGY (trypticase-glucose-yeast) est un milieu très riche permettant une croissance rapide du bacille subtil.
Préchauffer un tube de bouillon TGY en le plaçant au bain thermostaté à 37 °C pendant quelques minutes, puis l'ensemencer à raison de 1 goutte de préculture de *Bacillus subtilis* de moins de 24 heures sur bouillon ordinaire pour 2 mL de bouillon TGY. Agiter. Déclencher le chronomètre et placer aussitôt le tube au bain thermostaté à 37 °C.

■ ***Gamme de turbidité***
Le plus rapidement possible, prélever 8 mL de la préculture de *Bacillus subtilis* et transférer dans le tube 1. Obturer soigneusement le tube 1 et le placer immédiatement au réfrigérateur.
Prélever de nouveau 8 mL de la préculture de *Bacillus subtilis* et transférer dans le tube 1/2. Homogénéiser, puis prélever 8 mL du contenu du tube 1/2 et transférer dans le tube 1/4. Homogénéiser, prélever alors 8 mL du contenu du tube 1/4 et transférer dans le tube 1/8. Poursuivre ainsi le procédé jusqu'au tube 1/64. Obturer les tubes de la gamme ainsi réalisée et les placer au réfrigérateur.

■ ***Suivi de la croissance***
Régulièrement, comparer la turbidité du tube inoculé, en culture à 37 °C avec celle des tubes de la gamme. Noter les temps où la turbidité paraît identique à celle des tubes 1/64 – 1/32 – 1/16 – 1/8 – 1/4 – 1/2.
Remarque très importante : sortir le tube en culture du bain thermostaté à 37 °C pour des durées très brèves, sinon on perturbe la croissance qui ralentit lorsque la température baisse.

Résultats, observations et interprétation

A l'aide de la courbe de croissance dont la forme est décrite dans la *figure 18.2A*, interpréter les résultats expérimentaux obtenus.
Remarque : le temps qui sépare le passage de turbidité d'un tube de gamme au tube de gamme précédent correspond à un doublement de biomasse. Pendant la phase exponentielle de croissance, le temps de doublement de la biomasse est minimal et constant : c'est le temps de génération G.



2. Croissance de *Bacillus subtilis* sur milieu liquide riche (bouillon TGY), estimation de la croissance bactérienne par opacimétrie

Mots clés

Croissance bactérienne, opacimétrie, loi de Beer-Lambert appliquée aux milieux troubles.

Sécurité

Se reporter aux consignes de sécurité générales décrites au chapitre 12.

Principe

Estimation de la croissance bactérienne par opacimétrie : l'opacimétrie est une méthode photométrique s'appliquant aux milieux troubles. Elle consiste à mesurer l'intensité d'un faisceau lumineux directement transmis par la suspension microbienne. Moyennant certaines restrictions, la loi de Beer-Lambert s'applique si la concentration des particules en suspension est faible et si elles sont de petite taille. La mesure est faite à 650 nm. En première approximation, la loi de Beer-Lambert s'applique pour des absorbances allant de 0 à 0,7. Au-delà, il faut diluer à l'eau distillée de façon à effectuer la lecture dans la plage d'absorbance où la loi de Beer-Lambert s'applique. On a alors :

$$A_{650} = k\,C$$

expression dans laquelle C représente la concentration bactérienne.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

Une préculture de *Bacillus subtilis* : dans les conditions habituelles de travail stérile, ouvrir délicatement une capsule de Bactisubtil. Y plonger une öse stérile et refroidie. Après l'avoir chargée de spores, ensemencer un tube de bouillon ordinaire et l'incuber 24 heures à 37 °C.

■ ***Réactifs et milieux***

- Une fiole erlenmeyer de 250 cm^3, remplie de 150 cm^3 de bouillon TGY.
- 100 mL de liquide de dilution : bouillon TGY stérile, conservé au réfrigérateur.

■ ***Matériel***

- Une pipette graduée stérile de 5 cm^3.
- Un bain thermostaté, agité, réglé à 37 °C, à défaut un grand cristallisoir contenant de l'eau à 37 °C.
- Des cuves spectrophotométriques.
- Un spectrophotomètre.

Mode opératoire

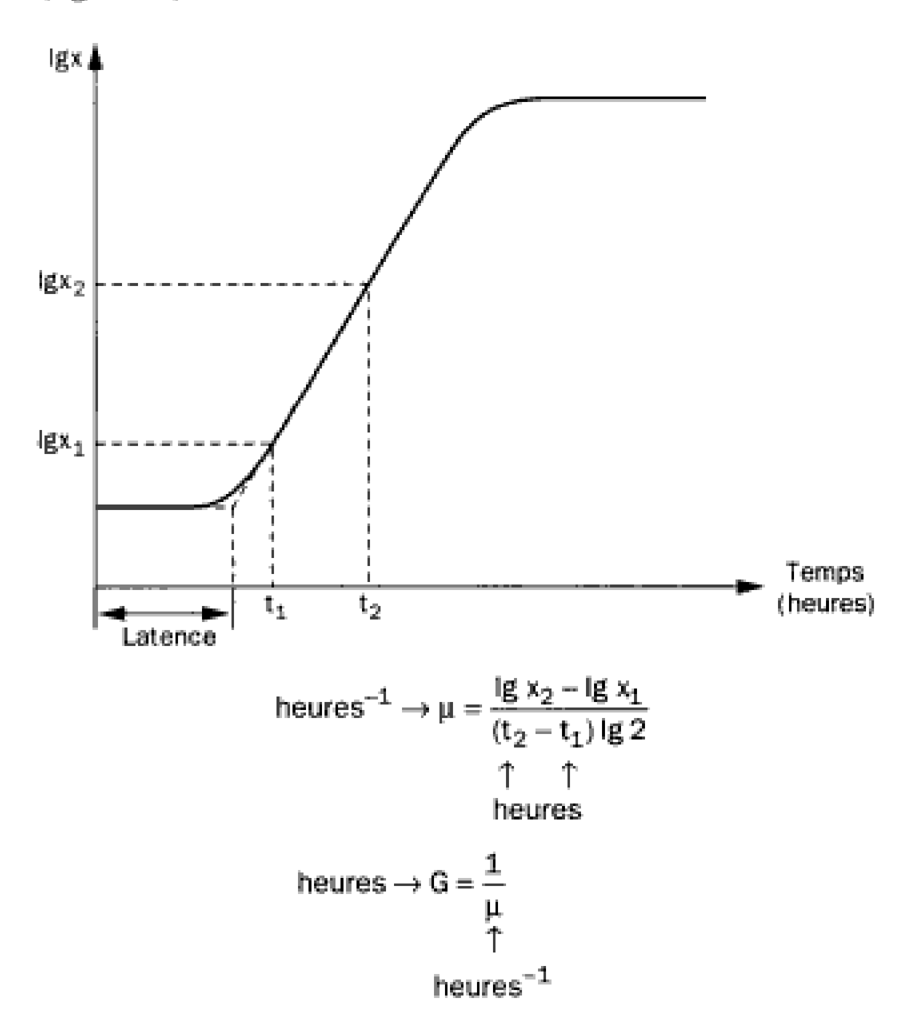
Le bouillon TGY (trypticase-glucose-yeast) est un milieu très riche permettant une croissance rapide du bacille subtil.

Préchauffer la fiole erlenmeyer contenant le bouillon TGY en la plaçant au bain thermostaté à 37 °C pendant quelques minutes, puis l'ensemencer en y introduisant le contenu du tube entier de préculture de *Bacillus subtilis* de moins de 24 heures sur bouillon ordinaire. Agiter et apprécier immédiatement son opacité en prélevant 3 cm^3 de milieu, dans des conditions de stérilité convenables et mesurer immédiatement son absorbance à

650 nm contre un blanc constitué d'eau distillée. La pipette stérile est replacée dans la fiole erlenmeyer.
Noter le temps qui devient le temps zéro.
Après 5 minutes d'incubation, effectuer un nouveau prélèvement de 3 cm^3 et mesurer son absorbance à 650 nm, comme il a été indiqué plus haut.
Recommencer la même opération à 10 minutes, puis à 15, 20, 30, 50, 70 et 90 minutes, enfin de 20 en 20 minutes jusqu'à la fin de l'expérience.
Si l'absorbance dépasse 0,7, diluer quantitativement l'échantillon avec du milieu TGY stérile et conservé au réfrigérateur.

Résultats, observations et interprétation

Tracer la courbe de croissance A_{650} = f (temps) et la courbe lg A_{650} = f (temps).
Déterminer le temps de latence L, le taux de croissance exponentiel binaire µ et le temps de génération G *(fig. 18.3)*.



$$\text{heures}^{-1} \rightarrow \mu = \frac{\lg x_2 - \lg x_1}{(t_2 - t_1) \lg 2}$$

↑ ↑
heures

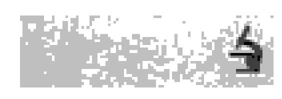
$$\text{heures} \rightarrow G = \frac{1}{\mu}$$

↑
heures^{-1}

Figure 18.3. Détermination des paramètres de croissance.



Sensibilité des bactéries aux antibiotiques, antibiogramme de *Bacillus subtilis*



Sensibilité des bactéries aux antibiotiques, antibiogramme de *Bacillus subtilis*

Mots clés

Sensibilité et résistance des bactéries aux antibiotiques.

Principe

L'antibiothérapie consiste à utiliser un ou plusieurs antibiotiques destinés à freiner le développement ou à tuer des bactéries ou des champignons ; il n'existe pas d'antibiotique contre les virus.
Actuellement, on utilise préférentiellement des antibiotiques ciblés précisément contre le germe à détruire, plutôt que des antibiotiques à spectre large qui peuvent induire le développement de germes résistants.
L'antibiogramme permet de déterminer l'antibiotique le plus adapté pour lutter contre le microbe.

Sécurité

Se reporter aux consignes de sécurité générales décrites au chapitre 12.

Matière d'œuvre

■ *Matériel biologique*

Une préculture de *Bacillus subtilis* : dans les conditions habituelles de travail stérile, ouvrir délicatement une capsule de Bactisubtil. Y plonger une öse stérile et refroidie. Après l'avoir chargée de spores, ensemencer un tube de bouillon ordinaire et l'incuber 24 heures à 37 °C.

■ *Réactifs et milieux*

- Une boîte de Pétri de gélose Muller-Hinton (le milieu Muller-Hinton est commercialisé prêt à l'emploi).
- Solutions d'antibiotiques à 200 mg/L :
  - pénicilline G,
  - gentamycine,
  - chloramphénicol,
  - spiramycine,
  - tétracycline.
- Un tube d'eau stérile.

■ *Matériel*

- Deux pipettes Pasteur.
- Une étuve réglée à 37 °C.
- Des disques de papier filtre stérile de 6 mm de diamètre.
- Des boîtes de Pétri stériles et vides.

Mode opératoire

Préparer une boîte de Pétri contenant de la gélose de Muller-Hinton. L'ensemencer par inondation. Pour cela, introduire 10 gouttes d'une culture de *Bacillus subtilis* sur bouillon ordinaire dans 2 cm^3 d'eau stérile, mélanger soigneusement. A l'aide d'une pipette Pasteur, verser 10 gouttes de cette suspension diluée dans la boîte et, en faisant osciller la boîte sur elle-même, inonder la totalité de la surface de la gélose. Aspirer le surplus de liquide. Sécher à l'étuve.

Pendant ce temps préparer des disques de papier stérile qui existent prêts à l'emploi dans le commerce. A défaut, on peut utiliser des disques de papier filtre sans cendre découpés au perforateur pour copies de classeur et stérilisés au four Pasteur à 105 °C.
On utilise 6 disques par boîte, un disque non imprégné qui sert de témoin et 5 essais.
Les disques sont imprégnés par des solutions d'antibiotiques dans des couvercles de boîtes de Pétri. Imprégner 5 disques des antibiotiques suivants :
- solution de pénicilline G à 200 mg/L ;
- solution de gentamycine à 200 mg/L ;
- solution de chloramphénicol à 200 mg/L ;
- solution de spiramycine à 200 mg/L ;
- solution de tétracycline à 200 mg/L.

Egoutter les disques et les sécher à l'étuve.
Disposer les 6 disques à la surface de la boîte *(fig. 19.1)*. Laisser diffuser 30 minutes à température ambiante puis incuber 24 heures à 37 °C.

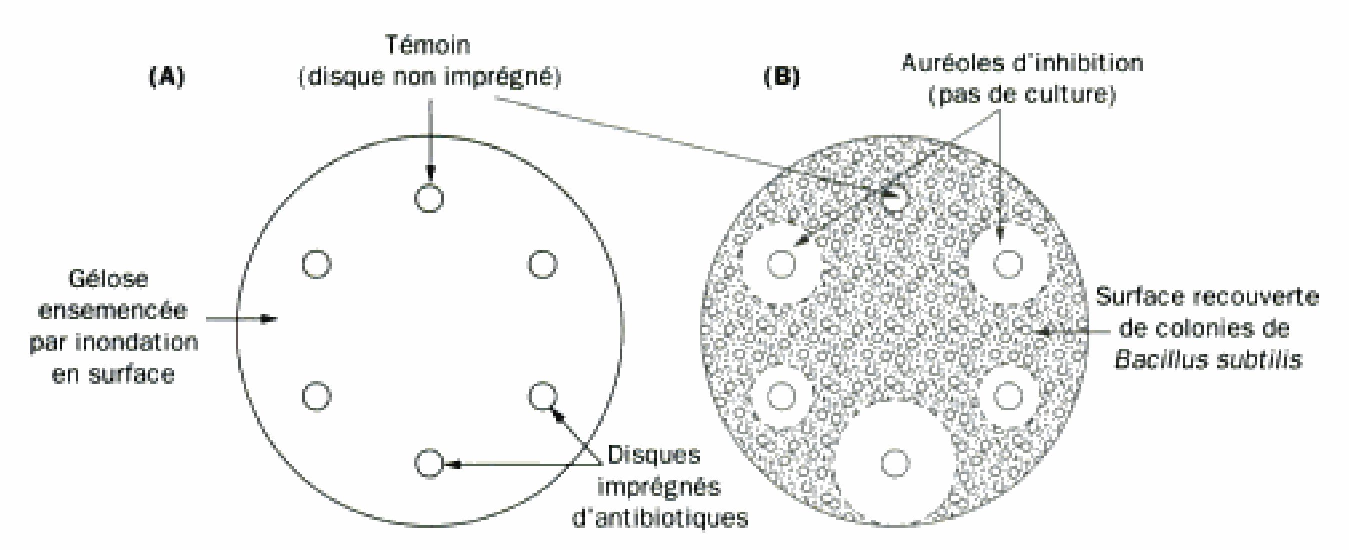


Figure 19.1. Etude de la sensibilité de *Bacillus subtilis* à certains antibiotiques.
(A) Boîte de Pétri avant incubation, ensemencée en surface par inondation avec la souche-test : *Bacillus subtilis*.
(B) Boîte de Pétri après incubation. Les auréoles d'inhibition sont d'autant plus grandes que l'antibiotique est efficace.

Résultats, observations et interprétation

Observer la surface de la boîte, une auréole d'inhibition autour d'un disque indique une inhibition de la croissance de la bactérie.
Interpréter et conclure sur l'efficacité des antibiotiques proposés.



La fermentation alcoolique

Sommaire

Page

La fermentation alcoolique

Mots clés

Fermentation, anaérobiose, glucose, alcool.

Principe

La levure de bière est aéro-anaérobie. En présence d'oxygène, son métabolisme est préférentiellement respiratoire mais, en anaérobiose, elle fermente le glucose en produisant de l'éthanol :

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2\ CH_3\text{-}CH_2OH + 2\ CO_2$$

Une première expérience, très simple à réaliser, permettra de mettre en évidence l'éthanol et le dioxyde de carbone produits, ainsi que la visualisation des cellules responsables de la fermentation.
Une seconde expérience permettra de suivre la cinétique de consommation du glucose et de déterminer le rendement de la fermentation.
Le glucose est dosé selon la méthode à l'hexokinase (voir II.11.1).
L'éthanol est dosé par la méthode à l'alcool déshydrogénase :

$$\text{Ethanol} + NAD^+ \xrightarrow{\text{Alcool déshydrogénase}} \text{Ethanal} + NADH + H^+$$

La réaction est rendue totale grâce à la réaction adjuvante suivante :

$$\text{Ethanal} + NAD^+ + H_2O \xrightarrow{\text{Ethanal déshydrogénase}} \text{Acide éthanoïque} + NADH + H^+$$

Le dosage de l'alcool est effectué sur le moût de fermentation après la consommation totale du glucose.

Sécurité

Se reporter aux consignes de sécurité générales décrites au chapitre 12.
Le dosage du glucose ne présente aucune difficulté majeure sur le plan de la sécurité. La triéthanolamine est un composé irritant, mais peu dangereux. Ne pas pipeter à la bouche le tampon triéthanolamine.



1. Etude qualitative de la fermentation alcoolique

Matière d'œuvre

Matériel biologique :

Préculture de *Saccharomyces cerevisiae* : introduire 12,5 g de levure de boulanger dans 70 cm^3 de mélange A + B (50 cm^3 A + 20 cm^3 B). Incuber pendant 2 heures à 30 °C.

■ *Réactifs et milieux*

– Milieu de culture A : introduire dans un ballon à étranglement stérile (à défaut un ballon ordinaire à fond plat) de 500 cm^3 :
  – extrait de levure 5 g
  – KH_2PO_4 25 g
  – $(NH_4)_2SO_4$ 0,6 g
  – eau distillée 300 cm^3

Boucher avec du coton cardé et du papier aluminium. Stériliser 20 minutes à 120 °C, sous 1 bar de pression.

– Milieu B :
  – glucose 20 g
  – eau distillée qsp 100 cm^3

Boucher avec du coton cardé et du papier aluminium. Stériliser 20 minutes à 120 °C, sous 1 bar de pression.

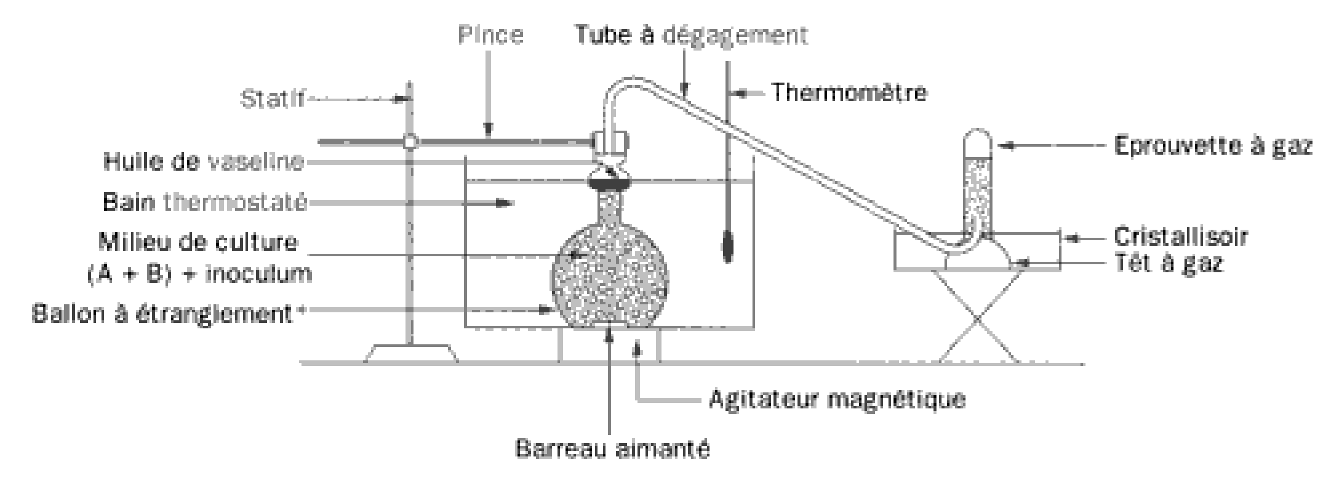
– Huile de vaseline stérile.
– Eau de chaux ou de baryte.

■ *Matériel*

– Un ballon à étranglement (à défaut, un ballon ordinaire à fond plat) de 500 cm^3.
– Un statif, une pince et une noix de serrage.
– Un bain thermostaté réglé à 30 °C (à défaut, un grand cristallisoir).
– Un agitateur magnétique.
– Un barreau aimanté.

Mode opératoire

Réaliser le montage présenté à la *figure 20.1*.



* Remarque : à défaut d'un ballon à étranglement, on peut utiliser un ballon à col droit.

Figure 20.1. Montage permettant l'étude qualitative de la fermentation alcoolique.

Régler la température du bain thermostaté à 30 °C.
Introduire stérilement le contenu du flacon B (100 cm^3) dans le ballon à étranglement contenant 300 cm^3 de milieu A stérile. Ensemencer stérilement avec 70 cm^3 de préculture de levure.
Recouvrir d'huile de vaseline stérile.
Observer le dégagement gazeux, le recueillir dans l'éprouvette à gaz. Caractériser ce gaz en y ajoutant un peu d'eau de chaux ou de baryte. Conclure.
Laisser la réaction se poursuivre jusqu'à la fin (arrêt du dégagement gazeux). Déboucher le flacon et caractériser l'alcool produit par son odeur.
Observer le milieu de culture au microscope en présence de bleu coton comme il est indiqué en III.13.3 : les levures sont nombreuses, certaines sont bourgeonnantes.

2. Cinétique et rendement d'une fermentation alcoolique

Matière d'œuvre

■ *Matériel biologique*

Préculture de *Saccharomyces cerevisiae* : introduire 12,5 g de levure de boulanger dans 70 cm^3 de mélange A + B (50 cm^3 A + 20 cm^3 B). Incuber pendant 2 heures à 30 °C.

■ *Réactifs et milieux*

– Milieu de culture A : introduire dans un ballon à étranglement stérile (à défaut un ballon ordinaire à fond plat) de 500 cm^3 :
  – extrait de levure 5 g
  – KH_2PO_4 25 g
  – $(NH_4)_2SO_4$ 0,6 g
  – eau distillée 300 cm^3

Boucher avec du coton cardé et du papier aluminium. Stériliser 20 minutes à 120 °C, sous 1 bar de pression.

– Milieu B :
  – glucose 20 g
  – eau distillée qsp 100 cm^3

Boucher avec du coton cardé et du papier aluminium. Stériliser 20 minutes à 120 °C, sous 1 bar de pression.

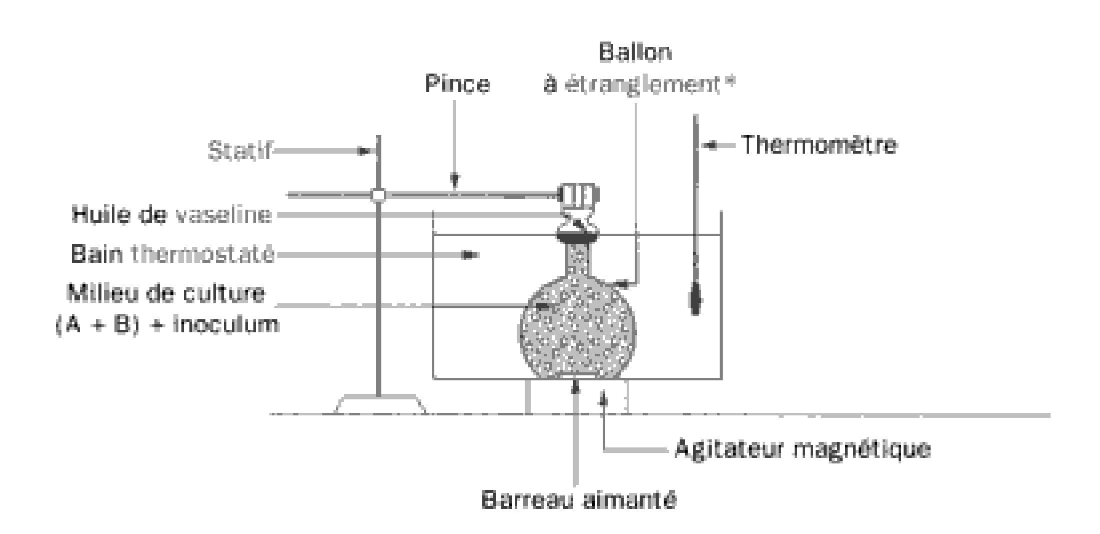
– Huile de vaseline stérile.
– Coffret de dosage du D-glucose dans les aliments.

■ *Matériel*

– Un ballon à étranglement (à défaut, un ballon ordinaire à fond plat) de 500 cm^3.
– Un statif, une pince et une noix de serrage.
– Un bain thermostaté réglé à 30 °C (à défaut, un grand cristallisoir).
– Un agitateur magnétique.
– Un barreau aimanté.
– Un spectrophotomètre.
– Cuves pour spectrophotomètre.
– Une fiole jaugée de 10 cm^3.
– Une fiole jaugée de 100 cm^3.
– Une fiole jaugée de 1 000 cm^3.
– Une pipette de 1 cm^3.
– Une micropipette Pipetman P200 Gilson.
– Une micropipette Pipetman P100 Gilson.
– Une micropipette de 20 µl, Pipetman P 20 Gilson.
– Une pipette graduée de 2 cm^3.
– Une pipette graduée de 5 cm^3.

Mode opératoire

Réaliser le montage présenté à la *figure 20.2*.
Régler la température du bain thermostaté à 30 °C.
Introduire stérilement le contenu du flacon B (100 cm^3) dans le ballon à étranglement contenant 300 cm^3 de milieu A stérile. Ensemencer stérilement avec 70 cm^3 de préculture de levure.



* Remarque : à défaut d'un ballon à étranglement, on peut utiliser un ballon à col droit.

Figure 20.2. Montage permettant l'étude cinétique de la fermentation alcoolique.

Recouvrir d'huile de vaseline stérile.
Déclencher le chronomètre, c'est le temps zéro.
Prélever immédiatement 4 cm^3 de moût de fermentation dans un tube à hémolyse stérile. Le plonger immédiatement dans la glace. Centrifuger le moût refroidi 2 minutes à 3 000 RPM (rotations par minute). Jeter le culot et replacer le surnageant dans la glace.
Répéter cette opération toutes les 20 minutes, durant 3 heures.

■ ***Dosage du glucose***

Le dosage est réalisé à l'aide du coffret de dosage du D-glucose dans les aliments (réf. Boehringer 716251).

• *Composition du coffret*

Le coffret contient :

– trois flacons -1- contenant environ 7,2 g de lyophilisat, composé de tampon triéthanolamine pH 7,6, de NADP : 110 mg, d'ATP : 260 mg, de sulfate de magnésium et de stabilisateurs,
– trois flacons -2- contenant environ 1,1 cm^3 de suspension enzymatique composée d'hexokinase (environ 320 UI) et de glucose-6-phosphate déshydrogénase (environ 160 UI),
– un flacon de solution aqueuse stabilisée de glucose (standard).

Remarque : la solution -1- est stable 4 semaines à + 4 °C et 2 mois à – 20 °C ; le contenu des flacons -2- est stable 1 an à + 4 °C. Il est nécessaire de ramener les solutions réactionnelles à 20-25 °C avant utilisation.

• *Préparation des solutions*

– Dissoudre le contenu d'un flacon -1- avec 45 cm^3 d'eau bidistillée.
– Utiliser le contenu d'un flacon -2- sans le diluer.
– Utiliser le contenu du flacon standard tel quel (la concentration est indiquée sur l'étiquette).

• *Dilution de l'échantillon*

La quantité de glucose dans la cuve doit être comprise entre 4 et 50 µg. La prise d'essai d'échantillon est comprise entre 0,1 et 2 cm^3, le volume est complété à 2 cm^3 en ajoutant de 1,9 à 0 cm^3 d'eau bidistillée *(tab. 20.I)*.

Tableau 20.I Tableau de dilution.

Concentration estimée de D-glucose en g/L d'échantillon	Dilution avec de l'eau distillée	Facteur de dilution F
< 0,5	–	1
0,5 à 5	1 + 9	10
5 à 50	1 + 99	100
> 50	1 + 999	1 000

• *Concentrations estimées du glucose dans le moût de fermentation*

Ne connaissant pas la teneur en glucose du moût de fermentation, on peut supposer, en première approximation, que la concentration du glucose est une fonction affine du temps et que la totalité de ce sucre est consommée en 3 heures *(tab. 20.II)*.

Tableau 20.II Tableau des concentrations estimées de glucose.

Temps en minutes	0	20	40	60	80	100	120	140	160	180
Concentration estimée en g/L de moût de fermentation	42	37	33	28	24	19	14	10	5	0
F = taux de la dilution à effectuer	100	100	100	100	100	100	100	100	10	1

• *Dosage*

Les essais sont réalisés directement dans la cuve spectrophotométrique, à une température ambiante comprise entre 20 et 25 °C.

Les absorbances sont lues contre l'air (pas de cuve dans le faisceau optique).

Introduire dans les cuves	Témoin	Essai
Solution -1- (en cm^3)	1	1
Moût de fermentation dilué d'un facteur F (en cm^3)		0,1
Eau bidistillée (en cm^3)	2	1,9
Mélanger avec une microspatule en plastique ou par retournement sur parafilm. Après 3 minutes environ, lire les absorbances à 340 nm (A_1) contre l'air et déclencher la réaction par addition de :		
Suspension -2- (en cm^3)	0,02	0,02
Mélanger comme il est indiqué ci-dessus, attendre la fin de la réaction (environ 10 à 15 minutes) et lire les absorbances à 340 nm (A_2) contre l'air. Si la réaction n'est pas terminée après 15 minutes, continuer à lire les absorbances de 5 en 5 minutes jusqu'à obtenir des absorbances (A_2) constantes sur 5 minutes.		

Calculer les différences d'absorbance du témoin et de chaque essai :

– $(A_2 - A_1)_{Témoin}$

– $(A2 - A1)_{Essai}$

Déduire la différence d'absorbance du témoin de celle de chaque essai, on obtient :

$$\Delta A_{Essai} = (A_2 - A_1)_{Essai} - (A_2 - A_1)_{Témoin}$$

• *Calcul*

En appliquant la loi de Beer-Lambert, la formule générale pour le calcul des concentrations dans le moût dilué devient :

$$c = \frac{3,02 \times 180 \times \Delta A}{\varepsilon \times d \times 0,1} \text{ g/L}$$

ε est le coefficient d'absorption molaire linéique du NADPH à 340 nm, sa valeur est $6,3.10^3$ $mol^{-1}.L.cm^{-1}$.

d est le trajet optique exprimé en cm (d = 1 cm).

La formule du calcul de la concentration de glucose dans le moût non dilué s'écrit :

$$c = 0,863 \times \Delta A \times F \text{ g/L}$$

• *Contrôle du dosage*

Le standard (solution -3-) est utilisé pour l'essai à la place de l'échantillon.

La concentration est mentionnée sur l'étiquette.

■ ***Dosage de l'éthanol***

Le dosage est réalisé à l'aide du coffret pour la détermination de l'éthanol dans les aliments (réf. Boehringer 176290).

• *Composition du coffret*

– Flacon 1 : contenant environ 100 cm^3 de solution de tampon diphosphate de potassium, pH 9,0 et stabilisateurs.
– Flacon 2 : renfermant 30 comprimés. Chaque comprimé contient :
  – 4 mg de NAD^+,
  – 0,8 U d'aldéhyde déshydrogénase,
  – stabilisateurs.
– Flacon 3 : contenant environ 1,6 cm^3 de solution d'alcool déshydrogénase. Stabilisateurs.
– Standard : solution aqueuse stabilisée d'éthanol.

• *Préparation des solutions*

– Utiliser le contenu du flacon 1 sans le diluer.
– Dissoudre un comprimé du flacon 2 avec 3 cm^3 de solution 1 selon le nombre de déterminations à effectuer. (Utiliser des pinces pour saisir les comprimés.)
– Utiliser le contenu du flacon 3 sans le diluer.
– Le standard s'utilise tel quel. La concentration est indiquée sur l'étiquette du flacon.

• *Dilution de l'échantillon*

La quantité d'éthanol dans la cuve doit être comprise entre 0,5 et 12 µg. La prise d'essai d'échantillon est égale à 0,1 cm^3 *(tab. 20.III)*.

Tableau 20.III Tableau de dilution.

Concentration estimée d'éthanol en g/L d'échantillon	Dilution avec de l'eau distillée	Facteur de dilution F
< 0,06	–	1
0,06 à 0,6	1 + 9	10
0,6 à 6	1 + 99	100
6 à 60	1 + 999	1 000
> 60	1 + 9 999	10 000

On peut estimer la concentration de l'alcool produit comprise entre 6 et 60 g/L, la dilution à effectuer est de 1 + 999 (facteur de dilution F = 1 000).

• *Dosage*

Les essais sont réalisés directement dans la cuve spectrophotométrique, à une température ambiante comprise entre 20 et 25 °C, en prenant soin de les couvrir avec du parafilm durant toute la mesure.

Les absorbances sont lues contre l'air (pas de cuve dans le faisceau optique).

Introduire dans les cuves	Témoin	Essai
Mélange réactionnel 2 (en cm^3)	3	3
Moût de fermentation dilué d'un facteur F = 1 000 (en cm^3)		0,1
Eau bidistillée (en cm^3)	0,1	0
Mélanger avec une microspatule en plastique ou par retournement sur le parafilm couvrant la cuve. Après 3 minutes environ, lire les absorbances à 340 nm (A_1) contre l'air et déclencher la réaction par addition de :		
Solution 3 (en cm^3)	0,05	0,05
Mélanger comme il est indiqué ci-dessus, attendre la fin de la réaction (environ 5 à 10 minutes) et lire les absorbances à 340 nm (A_2) contre l'air.		

Calculer les différences d'absorbance du témoin et de chaque essai :

– $(A_2 - A_1)_{Témoin}$

– $(A_2 - A_1)_{Essai}$

Déduire la différence d'absorbance du témoin de celle de chaque essai, on obtient :

$$\Delta A_{Essai} = (A_2 - A_1)_{Essai} - (A_2 - A_1)_{Témoin}$$

• *Calcul*

En appliquant la loi de Beer-Lambert, la formule générale pour le calcul des concentrations dans le moût dilué devient :

$$c = \frac{3,15 \times 46 \times \Delta A}{\varepsilon \times 2 \times d \times 0,1} \text{ g/L}$$

ε est le coefficient d'absorption molaire linéique du NADH à 340 nm, sa valeur est $6,3.10^3$ $mol^{-1}.L.cm^{-1}$.

d est le trajet optique exprimé en cm (d = 1 cm).

Le facteur 2 intervient au dénominateur, car deux moles de NADH sont formées pour une mole d'éthanol.

La formule du calcul de la concentration de l'éthanol dans le moût non dilué s'écrit :

$$c = 0,115 \times \Delta A \times F \text{ g/L}$$

• *Contrôle du dosage*

Le standard est utilisé pour l'essai à la place de l'échantillon.

La concentration est mentionnée sur l'étiquette.

Résultats, observations et interprétation

Tracer le graphe représentant la variation de la concentration massique de glucose en fonction du temps.

Analyser et interpréter les différentes parties de la courbe.

Calculer le rendement de cette fermentation. Le rendement se définit comme le rapport de la quantité d'éthanol réellement produite sur la quantité d'éthanol théoriquement produite. Interpréter.

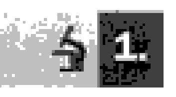


Cellules et tissus



Cellules et tissus végétaux

Sommaire Page



Les cellules épidermiques d'oignon

Mots clés

Cellule, tissu, paroi, vacuole.

Principe

A l'aide d'un tissu végétal de protection, mettre en évidence des cellules aux parois squelettiques et aux vacuoles particulièrement visibles.

Tous les êtres vivants sont formés d'une ou d'un ensemble de cellules, la cellule étant l'unité de base structurale et fonctionnelle.

Sur le vivant, l'observation détaillée des compartiments cellulaires est très difficile. Seule la paroi squelettique caractéristique de la cellule végétale apparaît clairement et détermine un groupement de logettes qui sont autant de cellules.

Sécurité

Pour le confort opératoire, « travailler » sous l'eau du robinet pour éviter l'irritation oculaire.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

- Bulbe d'Oignon.
- Feuille d'Elodée (à se procurer éventuellement dans les magasins d'aquariophilie).

■ ***Réactifs***

- Liquide de Ringer. Dans 950 mL d'eau distillée, dissoudre dans l'ordre suivant :
  - chlorure de Na^+ 6 g
  - chlorure de K^+ 0,25 g
  - chlorure de Ca^{2+} 0,1 g
  - hydrogénocarbonate de Na^+ 0,1 g

  Compléter à 1 000 mL avec de l'eau distillée.
- Solution iodo-iodurée :
  - iode 4 g
  - iodure de potassium 8 g
  - eau distillée 1 000 mL

  Dissoudre l'IK dans un peu d'eau distillée. A l'aide d'un agitateur, ajouter l'iode et compléter à 1 000 mL.

  Remarque : un pH basique ou une température élevée font disparaître la coloration.
- Solution de rouge neutre :
  - rouge neutre 0,02 g
  - liquide de Ringer 200 mL

  Colorant vital. N'utiliser que des solutions « fraîches ».

■ ***Matériel***

- Loupe à main.
- Microscope.
- Lames et lamelles.
- Ciseaux.
- Pinces fines.
- Aiguille lancéolée.

Mode opératoire

L'observation d'un fragment d'épiderme « interne » du bulbe d'oignon (*Allium cepa*, Liliacées) permet de prendre connaissance de l'essentiel de la structure de la cellule végétale *(fig. 21.1)*.

Le bulbe est constitué, de l'extérieur vers l'intérieur, par des écailles sèches, des écailles charnues (gorgées de réserves) et un bourgeon central, le tout implanté sur une très courte tige ou plateau porteur également de racines adventives à sa face inférieure *(fig. 21.2)*.

Plus précisément, la plupart des écailles sont des feuilles surchargées de réserves nutritives.

Les plus âgées, les plus externes donc les plus superficielles, sont desséchées et forment la « pelure ».

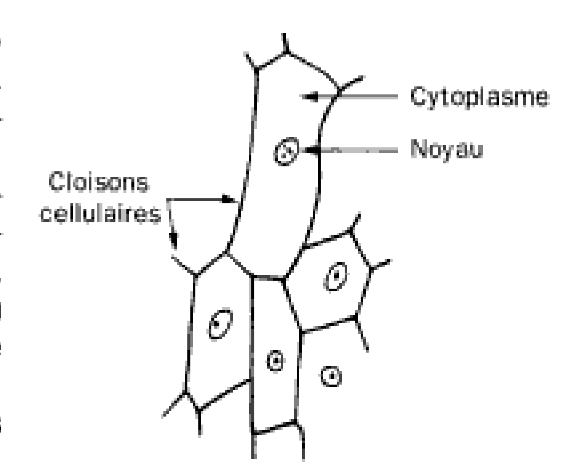


Figure 21.1. Cellules jointives de l'épiderme de l'oignon *(Allium cepa)* (× 120).

Les écailles moyennes permettent l'observation de cellules végétales caractéristiques.

Les plus jeunes, en position plus centrale, encore foliacées, entourent le bourgeon médian localisé au sommet du plateau caulinaire.

Prélever une écaille « moyenne » après avoir sectionné verticalement un bulbe d'oignon en trois ou quatre morceaux.

L'écaille moyenne choisie est de nature foliaire et possède un épiderme « externe » fortement lié au parenchyme épaissi de réserves et un épiderme « interne » qui, lui, s'en sépare facilement.

En augmentant la concavité de l'écaille avec les doigts, on « isole » une fine membrane translucide, l'épiderme « interne », unistratifié, c'est-à-dire formé d'une seule assise de cellules.

Avec une pince, recueillir cette membrane et l'immerger dans une solution de Ringer pour éviter son dessèchement *(fig. 21.3)*.

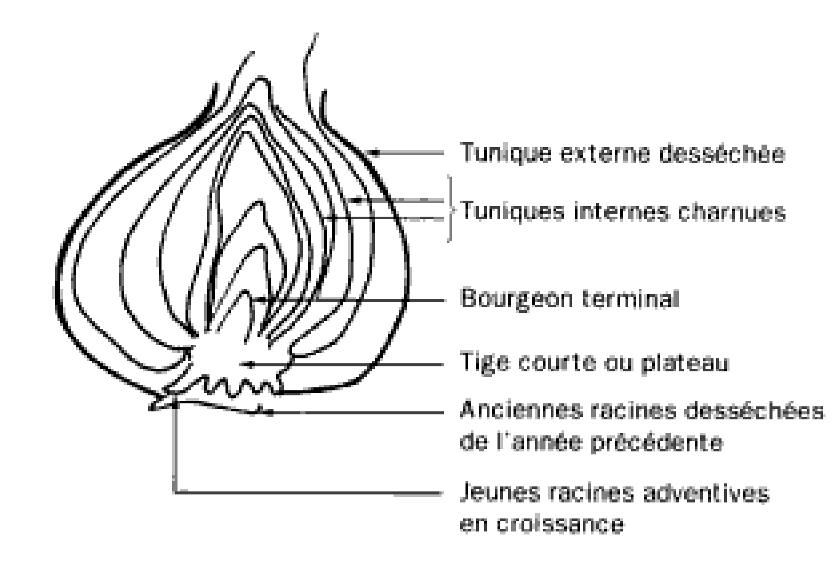


Figure 21.2. Coupe verticale d'un bulbe d'oignon.

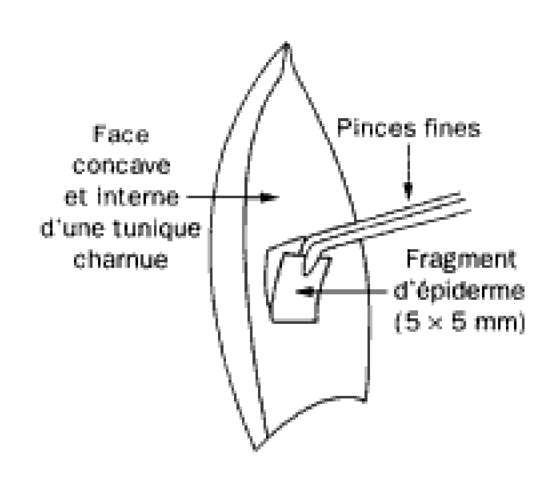


Figure 21.3. Prélèvement d'un fragment d'épiderme interne.

A l'aide d'une lame de rasoir, effectuer deux séries d'incisions perpendiculaires et découper alors des échantillons de 1 cm^2 environ pour les plonger ensuite dans trois verres de montre contenant respectivement :
- du liquide de Ringer (solution saline équilibrée conservant les cellules dans des conditions de vie proches de la normale) ;
- du Ringer associé à du rouge neutre (ce dernier pénètre dans la cellule sans la tuer et colore la ou les vacuoles existantes) ;
- une solution iodo-iodurée (l'iode est un fixateur qui tue la cellule en provoquant une fine coagulation du protoplasme vivant et aussi un colorant qui s'installe dans certains organites ainsi révélés).

Entre lame et lamelle, monter chaque fragment dans une goutte de son réactif et observer au microscope à un faible grossissement (objectif 4), puis à un plus fort grossissement (objectif 10, par exemple).

Résultats, observations et interprétation

■ *Observation de cellules vivantes*

Avec le *liquide de Ringer*, à l'objectif 4, l'épiderme apparaît formé de grandes cellules allongées de forme polyédrique, c'est-à-dire à contours géométriques, parfaitement jointives. Une cloison incolore « mitoyenne », d'épaisseur uniforme, sépare les diverses cellules. En réalité, chaque cellule est entourée d'une paroi squelettique propre, adossée à celle des cellules voisines par un ciment pectique formant la lamelle moyenne.

Le cytoplasme vivant contient des inclusions variées sous forme de sphérules ou de bâtonnets.

A l'objectif 10, on aperçoit mieux les relations entre les cellules.

Dans les cas favorables, les noyaux sont rendus visibles par leur réfringence. Chaque cellule contient un noyau lenticulaire à un à trois nucléoles sous forme de corpuscules brillants : le noyau est d'aspect variable, selon l'angle sous lequel il est observé, soit circulaire en position centrale, soit aplati et plaqué contre la paroi. La masse du noyau ou nucléoplasme est entourée par l'enveloppe nucléaire.

La membrane plasmique, qui limite extérieurement le cytoplasme tout comme dans la cellule animale, est indistincte car elle est appliquée contre la paroi squelettique.

Rechercher et dessiner quelques cellules juxtaposées bien « lisibles » *(fig. 21.4)*.

Le *rouge neutre* dilué se localise dans une volumineuse vacuole qui se trouve ainsi mise en évidence ; celle-ci contient également des substances dissoutes synthétisées et stockées par la cellule.

Remarque : la pénétration du rouge neutre dans les cellules de l'oignon n'est possible qu'en milieu neutre. En milieu

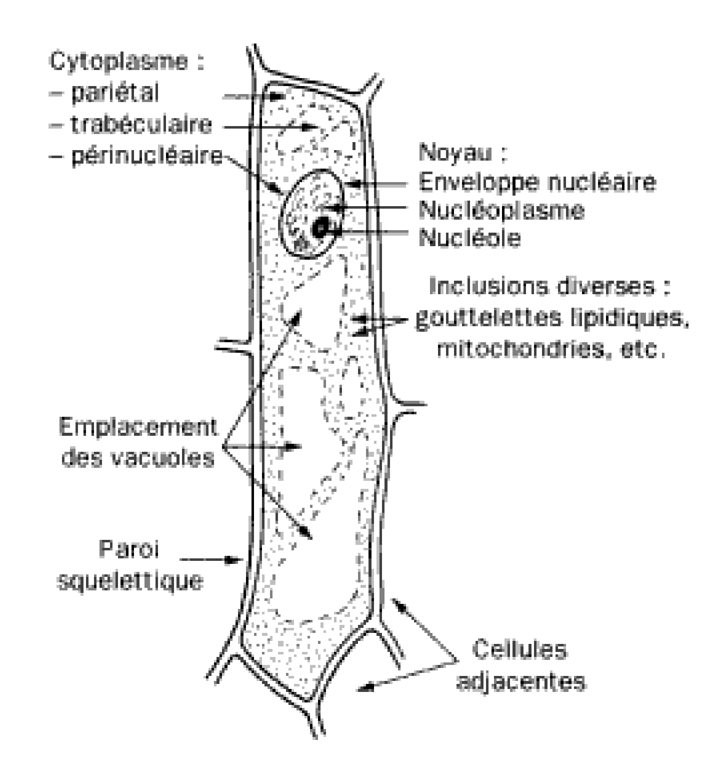


Figure 21.4. Cellule de l'épiderme interne de l'oignon *(Allium cepa)* (× 400).

franchement acide, il ne pénètre pas ; il s'accumule dans la paroi squelettique (qui n'est pas colorée dans les conditions normales de manipulation !).
L'importance de cette vacuole repousse le cytoplasme incolore et le noyau contre la paroi et traduit l'âge de la cellule observée : modeste dans la jeune cellule, l'appareil vacuolaire occupe pratiquement toute la cellule sénescente.
La vacuole centrale est traversée par de fines travées cytoplasmiques (ou trabécules) qui divergent à partir du noyau. Les mouvements de cyclose peuvent y être observés grâce aux granulations lipidiques claires se détachant sur le fond rose de la vacuole. Les cellules sont donc bien vivantes : le rouge neutre est un colorant vital et plus précisément vacuolaire.
Remarque : si l'observation se prolonge, certaines cellules meurent. Le rouge neutre teinte alors la cellule entière, cytoplasme et noyau compris.
Choisir une cellule correctement colorée et la dessiner à un fort grossissement.

■ ***Observation de cellules tuées***
Pour apprécier davantage la structure cellulaire, il convient de fixer les cellules, c'est-à-dire de les tuer en s'efforçant de modifier le moins possible la réalité des divers composants ; cependant, leur état physique est changé : les colorants employés à bon escient les coagulent ; au total cependant, la fixation et la coloration ont fait leur preuve.
Avec la solution iodo-iodurée, le fragment épidermique est coloré en brun clair, en particulier les noyaux. Le cytoplasme s'est précipité sous forme de paillettes jaune pâle à mettre en évidence par des variations de mise au point et à l'aide éventuelle du diaphragme.
Le cytoplasme révèle :
– une organisation granuleuse typique qui, au fort grossissement, s'avère formée de gouttelettes lipidiques réfringentes et de corpuscules (en granules ou en bâtonnets) non réfringents : les mitochondries ;
– une répartition « classique » autour de la vacuole (non visible directement ici) et sous la paroi (cytoplasme pariétal), autour de la vésicule nucléaire (cytoplasme périnucléaire) et même au travers de la vacuole (cytoplasme trabéculaire).
Observer au fort grossissement et choisir, en vue d'un croquis, une zone où l'on aperçoit bien les inclusions cellulaires ci-dessus.

Conclusion

La cellule végétale adulte est une unité vivante *(fig. 21.4)* qui se caractérise par sa forme polyédrique imposée par la paroi squelettique pectocellulosique, sa ou ses grandes vacuoles, son noyau contenu dans le cytoplasme rejeté pour l'essentiel à son pourtour et un compartiment qui lui est spécifique, le plaste (voir plus loin).
En effet, la paroi, les vacuoles et les plastes rendent originale la cellule végétale.
Leurs variations exprimées au niveau des tissus végétaux différenciés traduisent l'adaptation des végétaux supérieurs (les Angiospermes, en particulier) aux conditions les plus diverses de leur environnement dans le milieu aérien.
Au total, à côté de points communs avec la cellule animale (membrane plasmique, noyau, mitochondries, réticulum endoplasmique, inclusions diverses, etc.), la cellule végétale présente des structures et des compartiments originaux qui confèrent aux végétaux toutes leurs singularités au sein de la biosphère.

2. Les chloroplastes chez les Végétaux supérieurs (Angiospermes)

Mots clés

Chloroplaste, cytoplasme, vacuole, cyclose.

Principe

Mettre en évidence un compartiment cellulaire typiquement végétal : les chloroplastes, si importants dans le monde végétal par la photosynthèse dont ils sont l'objet.
Les chloroplastes sont reconnaissables à leur teinte verte ; ils sont le support de la chlorophylle associée à des pigments caroténoïdes (xanthophylle et carotène). Ils se rencontrent uniquement dans les organes exposés à la lumière. Chez les Spermaphytes, les épidermes n'en possèdent pas à l'exception des cellules des stomates et des cellules épidermiques des végétaux aquatiques.

Sécurité

Cette manipulation ne présente aucun danger.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

- Elodée (à se procurer éventuellement dans les magasins d'aquariophilie).
- Feuille de poireau, etc.

■ ***Matériel***

- Scalpel (ou lame de rasoir).
- Lames et lamelles.
- Microscope.
- Pinces fines.
- Aiguille droite.
- Eau distillée.

Mode opératoire

Faire le prélèvement d'une jeune feuille d'Elodée vert clair (g. *Elodea canadensis*, Hydrocharidacées, Monocotylédones) à proximité du bourgeon terminal d'une tige feuillée aquatique, ensuite montée directement entre lame et lamelle dans une goutte d'eau distillée.
La feuille d'Elodée est très mince et de structure simple, donc d'observation aisée *(fig. 21.5)*.
Il s'agit d'une observation vitale mettant en évidence les chloroplastes et les mouvements de cyclose.
A ce propos, laisser la préparation près d'une lampe pendant 10 à 15 minutes, le temps nécessaire pour échauffer la goutte d'eau qui sert de réactif jusqu'à une température de 20 à 25 °C.

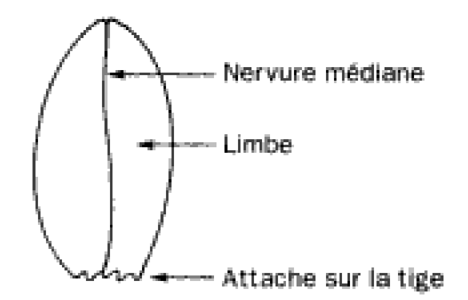


Figure 21.5. Feuille d'Elodée *(Elodea canadensis)*.

En effet, il convient de réaliser une uniformité de température, condition indispensable pour observer une cyclose continue, c'est-à-dire des mouvements de brassage affectant le cytoplasme.

A l'objectif 4, examiner la feuille allongée et denticulée, présentant des cellules étroites et allongées dans la région médiane, des cellules quadrangulaires ailleurs.
Apercevoir, si possible, les mouvements de cyclose dans la région médiane où ils sont en général mieux visibles.
A l'objectif 10, des séries de chloroplastes semblent progresser le long de la paroi squelettique, autour de la vacuole axiale : c'est le cytoplasme pariétal qui entraîne passivement les chloroplastes ; à un certain moment, ils s'arrêtent puis repartent.
Dans une cellule plus large, il est possible de voir des chloroplastes traversant la cellule de façon assez rapide ; ils sont entraînés le long d'un trabécule cytoplasmique « découpant » la vacuole.
On peut avoir l'impression de voir des chloroplastes « changer » de cellule : la feuille étant transparente et formée de deux couches de cellules au moins, c'est le chloroplaste d'une cellule de la couche inférieure qui a traversé sa propre cellule alors que la paroi superposée squelettique appartient, elle, à l'assise cellulaire supérieure.
Aussi, au fort grossissement, il convient de faire la mise au point précise à l'aide de la vis micrométrique sur la couche cellulaire de cellules foliaires. Observer successivement au faible grossissement (objectif 4), puis à un plus fort grossissement (objectif 10).

Résultats, observations et interprétation

L'essentiel du limbe foliaire est formé de deux couches de cellules chlorophylliennes superposées ; un massif plus conséquent de cellules allongées de petit diamètre définit la nervure.
Au fort grossissement, on observe dans chaque cellule des organites ovoïdes verts : les chloroplastes apparemment riches en chlorophylle *(fig. 21.6)*.
Ils occupent surtout le pourtour de la cellule de forme parallélipipédique (dont le centre est occupé par une grande vacuole), contenus dans le cytoplasme pariétal dont les mouvements de cyclose les entraînent passivement.
Ces mouvements (à raison de 10 µm à la seconde) favorisent l'accumulation des plastes dans les zones cytoplasmiques où l'éclairement est optimum pour les réactions photochimiques : contre la face la plus proche de la source lumineuse en éclairement faible ou bien contre les faces latérales en fort éclairement.

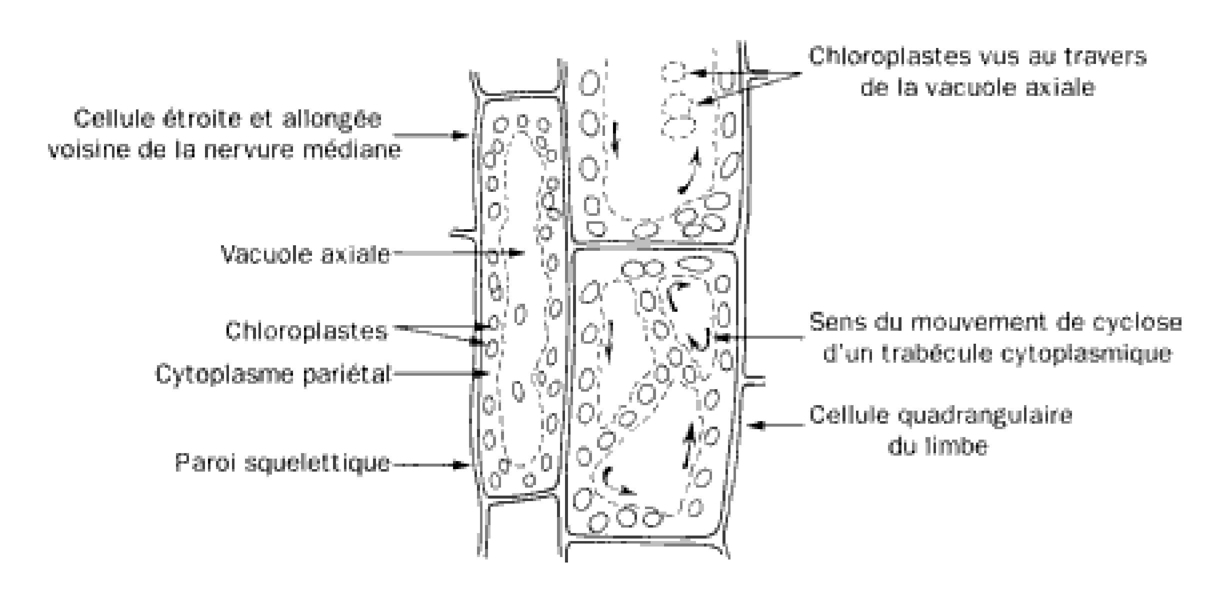


Figure 21.6. Cellules chlorophylliennes d'une feuille d'Elodée (Hydrocharidacées) (× 500).

Leur « trajet » précise d'ailleurs la répartition du cytoplasme en cytoplasme pariétal, périnucléaire et trabéculaire.
L'échauffement de la préparation dû à la proximité de la source lumineuse provoque une accélération des mouvements de cyclose.
Se rappeler que la cyclose concerne toute cellule vivante ; elle cesse à la mort de la cellule. Elle traduit l'activité du cytosquelette en vue de coordonner et d'homogénéiser les diverses régions cellulaires.
Faire un croquis d'une cellule chlorophyllienne et de son contenu chloroplastique *(fig. 21.6)*.
Remarque : le noyau, présent dans chaque cellule, est difficile à voir car il est très souvent masqué par les chloroplastes nombreux.

Conclusion

Les chloroplastes sont le siège de la photosynthèse. On sait que, à la lumière, ils synthétisent des produits organiques, de l'amidon entre autres qui disparaît au cours de la nuit, le maltose et le glucose issus de son hydrolyse étant véhiculés dans la sève élaborée et distribués dans toute la plante en vue d'une utilisation immédiate par les cellules ou d'une utilisation retardée au sein des amyloplastes sous forme d'amidon de réserve.



3. Les amyloplastes chez les Végétaux supérieurs (Angiospermes)

Mots clés

Amyloplaste, parenchyme de réserve.

Principe

Les amyloplastes sont des organites élaborateurs d'amidon, polysaccharide fort répandu dans les tissus végétaux les plus variés. Cependant, ils sont plus particulièrement abondants dans les parenchymes « de réserve », eux-mêmes contenus dans les organes de stockage (rhizomes, racines, tubercules, parenchyme ligneux, etc.).
La taille et la forme des grains d'amidon sont relativement constantes et par conséquent caractéristiques d'un genre de végétaux donné (voir I.2.6.5).

Sécurité

Cette manipulation ne présente aucun danger.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***
– La pulpe de pomme de terre (Solanacées).
– La pulpe de banane (Musacées) juste mûre.

■ ***Réactifs***
Solution iodo-iodurée : faire dissoudre 6 g d'iodure de potassium dans 100 mL d'eau distillée. Faire dissoudre 4 g d'iode bisublimé dans la solution obtenue. Conserver dans un flacon muni d'un bouchon de verre.
Il est vivement conseillé de déterminer empiriquement la dilution la plus favorable pour un matériel donné, en particulier pour l'observation du contenu des amyloplastes avec leurs dépôts concentriques.

■ ***Matériel***
– Microscope.
– Scalpel.
– Lames et lamelles.
– Aiguille lancéolée.
– Aiguille droite.
– Eau distillée.

Mode opératoire

Gratter doucement avec un scalpel la pulpe d'un fragment sectionné de tubercule de pomme de terre. Prélever un échantillon de taille modeste et aussi fin que possible. Etaler sur une lame porte-objet et y déposer une goutte d'eau iodée. Recouvrir ensuite d'une lamelle.

■ ***Variante***
Réaliser une coupe transversale dans la banane *(fig. 21.8)* : observer son « écorce » avec des nervures bien visibles, sa pulpe et les trois cavités carpellaires à placentation axile, remplies de filaments microscopiques mous.
Sur la pointe d'un scalpel, prélever 1 à 2 mm de pulpe immédiatement sous l'écorce et l'écraser doucement dans une goutte d'eau distillée entre lame et lamelle (les cellules de

la pulpe se séparent d'elles-mêmes lors de l'aplatissement car leur lamelle moyenne intercellulaire est déjà gélifiée).
Utiliser la même manipulation avec un échantillon de la zone centrale de la banane.
Refaire ensuite les deux mêmes opérations avec la solution iodée à la place de l'eau : laisser les fragments dans la solution pendant 1 à 2 minutes avant de placer la lamelle. On les voit se colorer progressivement.
Observer au microscope (bien diaphragmer pour observer le pourtour des cellules) et dessiner.

Résultats, observations et interprétation

Les cellules polyédriques et sans méat du parenchyme amylifère de la pomme de terre sont encombrées d'amyloplastes colorés en bleu foncé par l'eau iodée *(fig. 21.7)*.

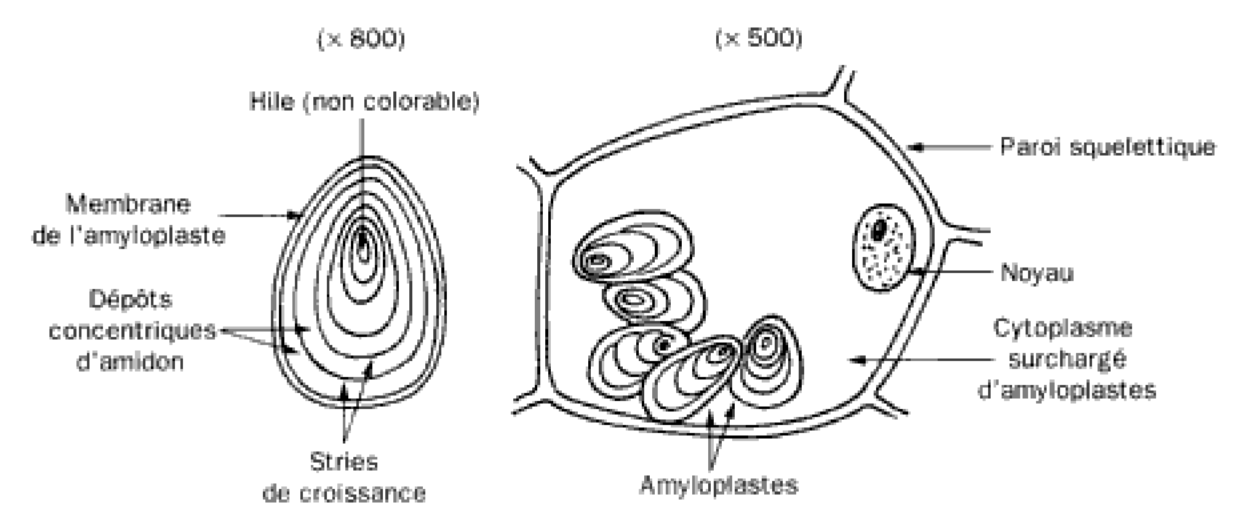


Figure 21.7. Cellules de parenchyme de tubercule de pomme de terre (Solanacées).

Chaque amyloplaste accumule l'amidon qu'il a synthétisé à partir des nutriments apportés par la sève élaborée ; il se répartit en couches concentriques alternativement claires et sombres (dues à une différence dans le degré d'hydratation des dépôts successifs), autour d'un hile excentrique non coloré *(fig. 21.7)*.
Cette accumulation peut être considérable. Se déposant en couches successives, l'amidon distend la matrice plastidiale dont il ne subsiste finalement qu'une fine pellicule, pouvant même disparaître. Les volumineux amyloplastes dont la matrice a disparu sont nommés « grains d'amidon ».
Prévoir le schéma d'une cellule amylifère et celui d'un amyloplaste bien identifiable.
La banane est un fruit dérivé de trois carpelles comportant une partie externe fibreuse (« écorce ») et une partie interne riche en amidon (pulpe amylifère) *(fig. 21.8)*.
Dans celle-ci, les cellules disjointes et « libres » (par suite de la gélification du

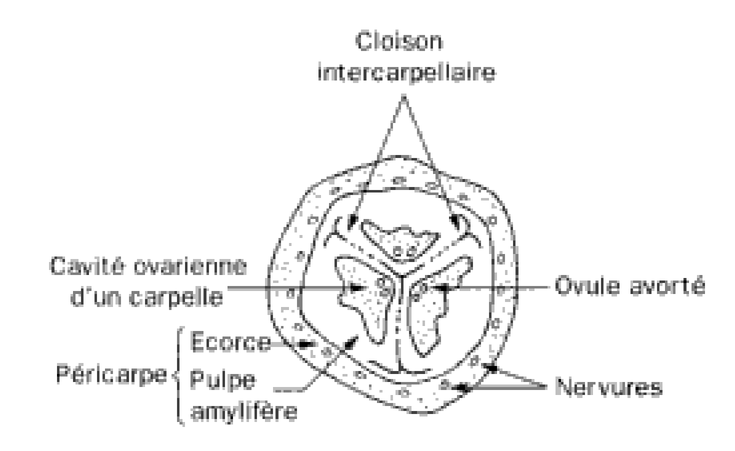


Figure 21.8. Coupe transversale de la banane (Musacées).

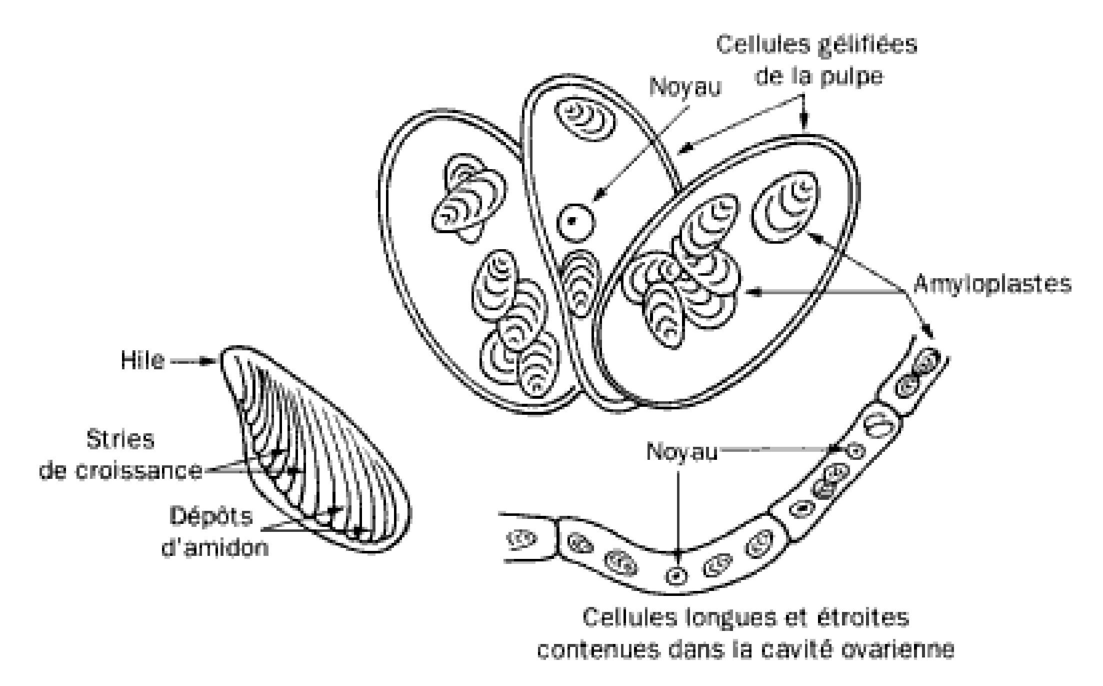
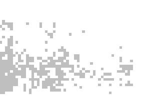
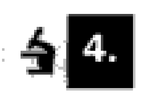


Figure 21.9. Cellules de la pulpe de banane (Musacées).

ciment pectique de la lamelle moyenne lors de la maturation de la banane) contiennent des amyloplastes allongés, brillants, colorés en violet par l'eau iodée *(fig. 21.9)*. Certains aux contours découpés traduisent un début de lyse, c'est-à-dire de digestion chimique.
Dans la zone centrale, les filaments tapissant les cavités ovariennes sont des files de cellules étroites et allongées, contenant elles aussi des amyloplastes, plus petits que les autres mais identifiables par leur coloration à l'eau iodée.

Conclusion

Les réserves accumulées par les amyloplastes sont destinées à être utilisées, à plus ou moins longue échéance, par les cellules d'un « germe » qui entame sa croissance : la plantule d'une graine, le bourgeon d'un tubercule, d'un rhizome ou d'un bulbe, les bourgeons des plantes ligneuses, etc.

4. Les chromoplastes chez les Végétaux supérieurs (Angiospermes)

Mots clés

Chromoplastes, pigments.

Principe

Les végétaux chlorophylliens présentent ponctuellement des organes dont la couleur, souvent vive, tranche sur leur « ambiance verte », organes végétatifs (tubercules, etc.) ou reproducteurs (pétales de fleurs, fruits charnus, etc.).
Les chromoplastes sont colorés en jaune, en orangé ou en rouge ; ils synthétisent des pigments caroténoïdes (xanthophylle, carotène, etc.). Leurs formes sont variées, souvent irrégulières et anguleuses par suite de l'existence de pigments à l'état cristallin.

Sécurité

Cette manipulation ne présente aucun danger.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***
– Pulpe de tomate mûre (Solanacées).
– Pulpe du fruit de l'églantier (Rosacées).
– Tubercule de carotte (Ombellifères).
– Epiderme des pétales de certaines fleurs (Forsythia, Glaïeul jaune, etc.).

■ ***Matériel***
– Microscope.
– Lames et lamelles.
– Scalpel ou lame de rasoir.
– Pinces fines.
– Aiguille lancéolée.
– Eau distillée.

Mode opératoire

D'une tomate mûre bien rouge prise comme exemple, extraire un petit fragment de pulpe encore ferme, non gélifiée à l'aide d'une aiguille lancéolée et le monter dans une goutte d'eau distillée entre lame et lamelle. Observer au microscope.

Résultats, observations et interprétation

La tomate renferme des chromoplastes incolores au sein du cytoplasme qui ont synthétisé des cristaux ou des aiguilles de lycopène. Parfois, la lyse des cellules de la pulpe explique la dispersion du lycopène dans la préparation *(fig. 21.10)*.
Préciser à l'aide d'un dessin la forme des cristaux de lycopène encore contenus dans les chromoplastes ou répandus dans le cytoplasme adjacent *(fig. 21.11)*.

Conclusion

Suivant les espèces végétales, les chromoplastes se présentent sous des formes variées : en disques, en fuseaux ou encore en organites à contours irréguliers.
Les pigments qu'ils élaborent peuvent s'accumuler à l'état de cristaux (comme ici chez la tomate) ou bien occuper leur stroma de manière homogène.

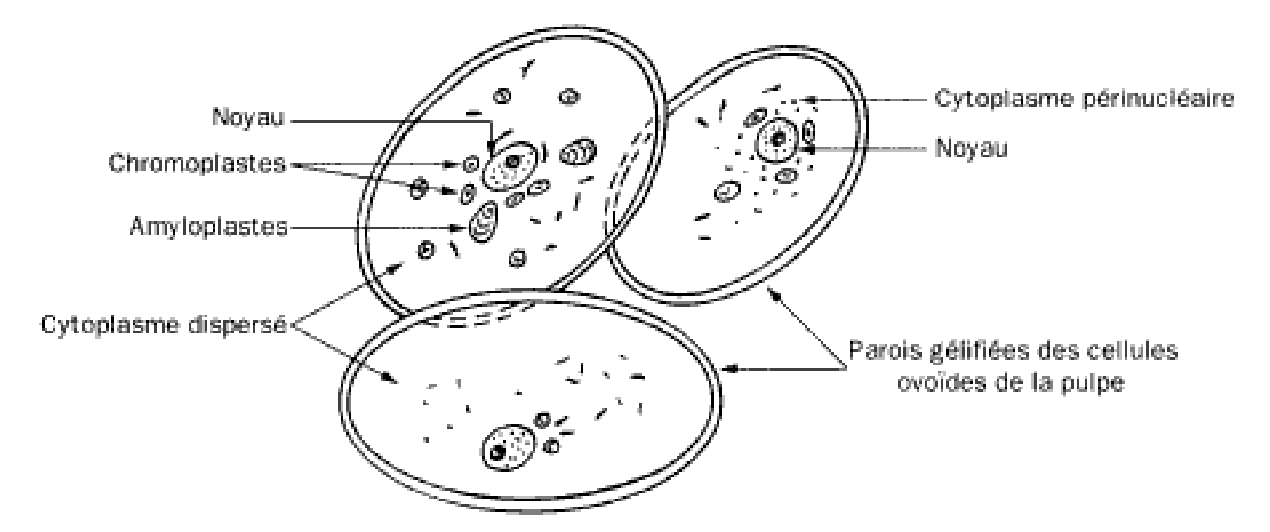


Figure 21.10. Cellules de la pulpe de tomate.

Leur rôle est mal précisé car, s'ils semblent participer à la coloration des pétales de fleurs et à celle des fruits (tomate, piment, etc.), ils se retrouvent parfois dans les racines (carotte, etc.).

Souvent, les chromoplastes se différencient tardivement lors de la maturation des fruits, fréquemment à partir des chloroplastes (poivron, tomate, piment, etc.), parfois à partir d'amyloplastes (carotte, etc.), voire de proplastes.

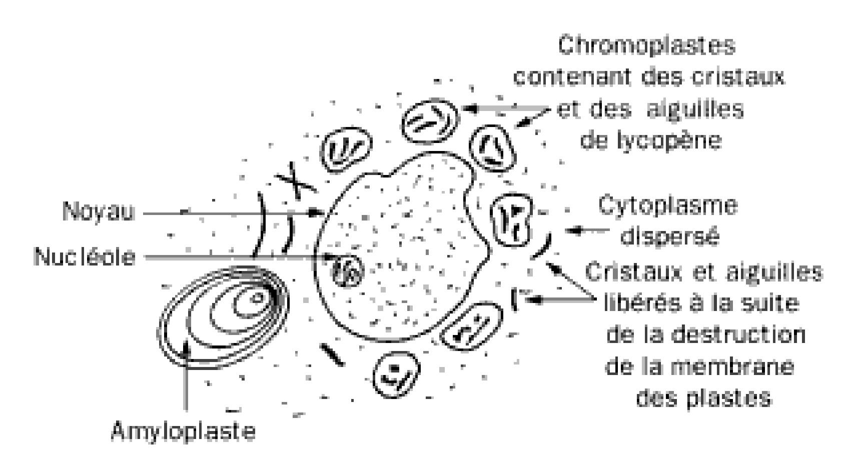


Figure 21.11. Les chromoplastes de la tomate (× 1 000).

La signification de ces organites n'est pas évidente : signaux colorés, ils semblent rendre plus attractif l'organe qui les contient (pétales, fruits, etc.) vis-à-vis des animaux (insectes, oiseaux, mammifères, etc.), en vue d'accroître son efficacité biologique dans la pollinisation, la dispersion des semences, etc. Dans cet esprit, il est possible de considérer la spécialisation des chromoplastes comme un facteur de diversification des Angiospermes, c'est-à-dire des végétaux les plus évolués à l'heure actuelle.

Conclusion générale

■ ***Les relations entre les types de plastes***

Les *chloroplastes*, les *amyloplastes* et les *chromoplastes* sont des plastes fonctionnels, élaborateurs de pigments ou de réserves, qui dérivent de petites vésicules ou proplastes, enfermées dans les cellules méristématiques à caractères embryonnaires.

Selon l'organe où ils se trouvent, leur différenciation en fait des amyloplastes ou des chloroplastes qui, à leur tour, peuvent devenir des chromoplastes.

Ainsi, les proplastes se transforment dans la racine en amyloplastes, dans les très jeunes feuilles en chloroplastes, dans les pétales floraux (lis, etc.) en chromoplastes.

Les interconversions sont assez fréquentes : le chloroplaste évolue en chromoplaste lors de la maturation des fruits, l'amyloplaste devient chloroplaste à l'occasion du verdissement des tubercules de pomme de terre fortuitement exposés à la lumière.

Au total, la lignée plastidiale s'avère ainsi très souple.

5. Evolution des vacuoles végétales

Mots clés

Vacuole, mérèse, auxèse, coiffe.

Principe

Les vacuoles, cavités ménagées dans le cytosol, constituent un compartiment cellulaire riche en eau et en substances dissoutes et jouent ainsi un rôle important dans la croissance et l'économie de la cellule végétale.
Leur état est fonction de la catégorie et du stade de différenciation des cellules végétales.
Des changements morphologiques traduisent l'évolution vacuolaire durant la vie de la cellule.
On peut suivre cette évolution lors de l'auxèse, c'est-à-dire lors du grandissement cellulaire.

Sécurité

Cette manipulation ne présente aucun danger.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***
Racines de blé ou autre graminée (orge, maïs, etc.) : se procurer des semences non traitées (aptes à germer aisément).

■ ***Réactifs***
Coloration au rouge neutre (dans solution de Ringer), composition (IV.21.1).

■ ***Matériel***
– Microscope.
– Lames et lamelles.
– Lame de rasoir.
– Pinces fines.
– Aiguille montée.

Mode opératoire

Déposer des grains de blé (achetés dans le commerce, si nécessaire) sur une feuille de papier filtre humide sur le fond d'une assiette recouverte d'une plaque de verre. Quelques jours plus tard (4 à 6 jours), chaque grain a développé quelques racines.
Immerger dans une solution de Ringer complétée de rouge neutre.
Prélever les 5 à 8 mm de l'extrémité d'une racine. Faire le montage entre lame et lamelle dans une goutte de réactif.
Appuyer légèrement sur la lamelle de manière à dissocier les cellules sans les écraser ; ainsi, les cellules desquamantes de la coiffe se détachent-elles des cellules embryonnaires (ou méristématiques).
Observer au microscope (objectif 4). Rechercher près de l'extrémité une zone où les cellules sont petites et toutes semblables : ce sont des cellules embryonnaires sans différenciation qui constituent le méristème primaire de la racine, responsable de la croissance en longueur.
En s'éloignant de cette zone, les cellules s'allongent selon l'axe racinaire, deviennent parallélipipédiques et accèdent à leur forme adulte.

Résultats, observations et interprétation

De la coiffe vers la « base » de la racine, on distingue l'évolution vacuolaire suivante *(fig. 21.12)* :

– les cellules méristématiques avec de petites vacuoles globuleuses ou filamenteuses, peu hydratées, bien colorées et nombreuses ;
– les jeunes cellules en cours d'allongement (ou auxèse) avec des vacuoles moins nombreuses (car elles gonflent et confluent entre elles) qui s'hypertrophient et apparaissent moins intensément colorées par suite d'une entrée d'eau ;
– les cellules plus longues et plus larges, pratiquement adultes avec encore quelques vastes vacuoles rosées ;

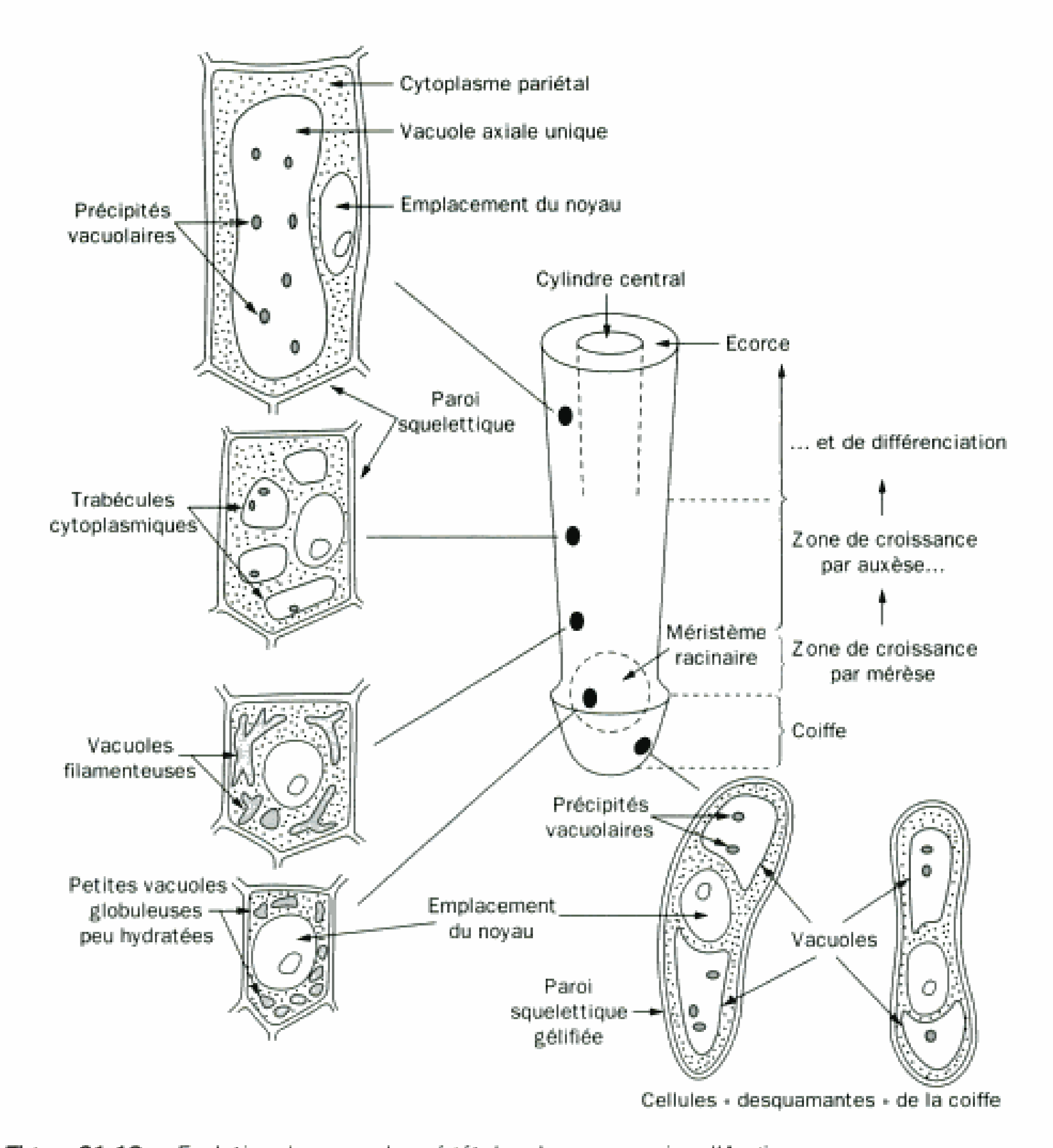


Figure 21.12. Evolution des vacuoles végétales dans une racine d'Angiospermes.

– les cellules adultes à une seule grande vacuole centrale peu colorée, ayant repoussé le cytoplasme et le noyau en périphérie.

Dans les cellules adultes ou vieillissantes, des taches plus colorées en rose apparaissent : elles sont dues à des précipités du contenu vacuolaire.

Remarque : la coiffe, originalité de la racine, présente quelques particularités cytologiques. Ainsi, au cours de leur évolution, les cellules périphériques de la coiffe deviennent-elles sénescentes et finissent par desquamer, facilitant ainsi l'observation de l'évolution vacuolaire.

Cytologiquement, elles présentent souvent deux vacuoles ménageant l'emplacement du noyau et du cytoplasme résiduel.

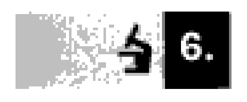
Dessiner les stades les mieux visibles.

Remarque : le grandissement évoqué ici n'est pas toujours irréversible. Ainsi, lorsque les cellules se dédifférencient à l'occasion d'une multiplication végétative, de la mise en place d'une assise génératrice secondaire, etc., les vacuoles se morcellent. Cette réduction vacuolaire aboutit à une diminution de la taille des cellules.

Conclusion

L'évolution est pratiquement la même pour les cellules dérivées des méristèmes racinaires et caulinaires.

Petites, nombreuses, peu hydratées (et donc bien colorées) dans les cellules méristématiques, les vacuoles grandissent par hydratation et se soudent bientôt en une vaste vacuole unique ; la pression qu'elles exercent sur la paroi squelettique, rendue déformable par suite de l'intervention de l'auxine, en fait ainsi le « moteur » de l'auxèse cellulaire.



6. Les tissus de la feuille de poireau Présentation sommaire de quelques tissus végétaux

Mots clés

Epiderme, stomate, parenchyme, trachéide, vaisseau ligneux.

Principe

Chez la plupart des végétaux, les activités biologiques variées sont l'œuvre d'organes formés chacun de groupements cellulaires ou de tissus différents : il y a en effet une répartition du travail physiologique au sein de l'organisme.
On nomme « tissu » un ensemble continu de cellules souvent de même origine, de structure et de fonction identiques. Les tissus sont alors classés en vertu du rôle qu'ils jouent dans le végétal. On distingue ainsi les tissus de nutrition (ou parenchymes), les tissus de protection (épiderme et liège), les tissus conducteurs de sève (le xylème et la sève brute, le phloème et la sève élaborée), etc.
L'originalité de ces tissus végétaux réside dans les différenciations que réalisent les compartiments typiques de leurs cellules (voir plus haut : paroi, plastes, vacuole), compartiments responsables des particularités biologiques des organismes végétaux.

Sécurité

Cette manipulation ne présente aucun danger.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

Feuille assez épaisse telle la feuille de poireau (*Allium porrum*, Liliacées) ou similaire.

■ ***Matériel***

- Microscope.
- Pince.
- Aiguille droite.
- Lame de rasoir.
- Lames et lamelles.
- Compte-gouttes.
- Eau distillée.

Mode opératoire

Prendre l'exemple des tissus foliaires du poireau *(fig. 21.13)*.
Faire une courte incision dans le limbe foliaire avec une lame de rasoir. Soulever un morceau d'épiderme en évitant d'entraîner des tissus adjacents à l'aide de pinces fines. Découper un échantillon d'épiderme blanchâtre et le déposer à plat dans une goutte d'eau distillée disposée sur une lame. Recouvrir d'une lamelle. Observer au microscope.
Puis, écraser doucement entre lame et lamelle un fragment de feuille débarrassée au préalable de ses deux épidermes, supérieur et inférieur, afin d'étudier le parenchyme foliaire chlorophyllien ou mésophylle et les tissus conducteurs distribués au niveau des nervures.

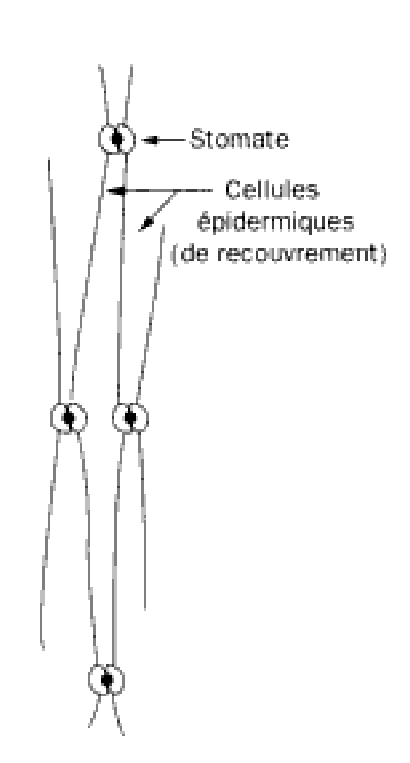


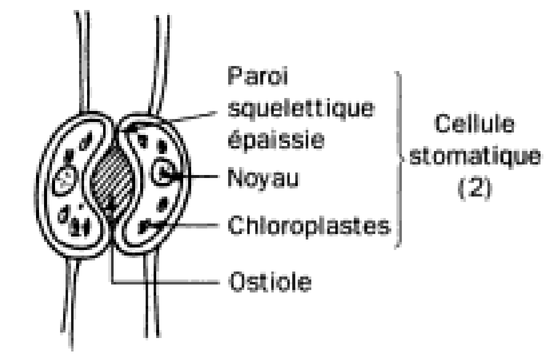
Figure 21.13. Epiderme de feuille de poireau (*Allium porrum*, Liliacées).

Résultats, observations et interprétation

L'épiderme est un tissu de revêtement *(fig. 21.13)* assurant la protection des organes vis-à-vis du milieu extérieur, limitant les pertes hydriques et formant une barrière contre les agents pathogènes.

L'épiderme, au faible grossissement (objectif 4), comprend deux catégories de cellules localisées dans des plans différents. Pour cela, il convient de faire deux mises au point :

– en surface, les cellules épidermiques, allongées et polyédriques, incolores, comparables à celles de l'oignon (voir plus haut) ;
– en « profondeur », les « cellules de garde » des stomates, en forme de haricot et en contact deux par deux, riches en chloroplastes *(fig. 21.14)*. Leur paroi cellulosique est plus épaisse au niveau de leur concavité, délimitant une ouverture de diamètre variable ou ostiole, propice aux échanges gazeux (respiratoires et chlorophylliens).



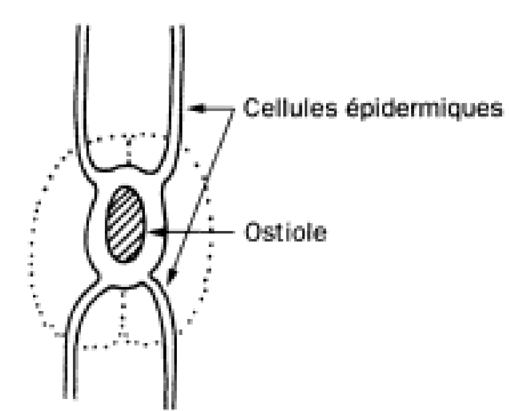


Figure 21.14. Les cellules stomatiques du poireau (*Allium porrum*, Liliacées) (× 350).

Le mésophylle est représenté par un parenchyme chlorophyllien abondant formé de cellules polyédriques à chloroplastes, délimitant entre elles des interstices ou méats intercellulaires nécessaires aux échanges gazeux en relation avec les ouvertures stomatiques *(fig. 21.15)*.

Il existe deux sortes de cellules, à parois minces :

– des cellules allongées localisées le long des nervures, « profondes », peu riches en chloroplastes, à noyau visible ;
– des cellules isodiamétriques, « périphériques », aux chloroplastes abondants.

Les tissus conducteurs sont composés de deux éléments :

– le xylème qui assure la circulation de la sève brute, solution aqueuse de sels minéraux, puisée dans le sol ;
– le phloème qui distribue la sève élaborée au niveau de la feuille, solution plus ou moins riche en constituants organiques, en saccharase en particulier.

Ici, seul le xylème est nettement observable avec des trachéides et des vaisseaux ligneux, accompagnés de longues cellules parenchymateuses incolores.

Chaque élément conducteur est formé par une file de cellules dont la partie vivante a disparu : ce sont des cellules « mortes » réduites à leurs parois plus ou moins épaissies. Les cloisons transversales ou obliques ont persisté (trachéides) ou ont plus ou moins disparu (vaisseaux).

Dans l'échantillon, observer essentiellement les trachéides annelées et spiralées.

Consigner les résultats de votre étude à l'aide d'un dessin montrant les cellules chlorophylliennes et les éléments conducteurs d'une nervure ainsi que leur disposition au sein de l'échantillon *(fig. 21.15)*.



7. Les tissus conducteurs d'une tige de Cucurbitacée

Mots clés

Xylème, phloème, sève brute, sève élaborée.

Principe

Les tissus conducteurs (xylème et phloème) assurent l'alimentation de l'ensemble du végétal, d'abord en sève brute, puisée dans le sol et transportée par le xylème vers les feuilles dans lesquelles ensuite, par photosynthèse, sont fabriqués les produits organiques, distribués à leur tour par le phloème sous forme de sève élaborée.

Ces tissus forment deux systèmes distincts transportant les sèves dans l'organisme végétal. A cet effet, ils comportent chacun des éléments allongés mis bout à bout verticalement (dans le cas d'un végétal à port dressé) de façon à constituer des « tuyaux », mais des « tuyaux » qui seraient éventuellement compartimentés par des cloisons transversales ou obliques.

Ces deux tissus sont d'ailleurs des complexes tissulaires, c'est-à-dire que, contrairement aux autres tissus végétaux, leurs composants sont diversifiés avec des éléments conducteurs fonctionnels associés à un parenchyme d'accompagnement :

– les « vaisseaux » conducteurs de la sève brute et leur parenchyme qui se lignifie plus tardivement forment les faisceaux vasculaires ou xylème ;
– les tubes criblés conducteurs de la sève élaborée et leur parenchyme forment les faisceaux criblés ou phloème.

■ ***Le xylème*** *(fig. 21.20)*

Il conduit la sève brute, solution aqueuse, fluide, non utilisable directement, puisée dans le sol par les racines, souvent appelée sève ascendante.

Ses éléments fonctionnels ou « vaisseaux » sont lignifiés.

La lignine, matière inerte, se dépose diversement selon les « vaisseaux » (voir la classification ci-dessous), mais ce dépôt est toujours interne par rapport à la paroi cellulosique primitive de l'élément conducteur.

Dans une région « jeune », en cours de croissance et métaboliquement très active, proche d'une zone méristématique dont elle dérive, apparaissent les premiers « vaisseaux » dérivés des cellules procambiales (récentes cellules méristématiques déjà allongées et disposées en files).

Dans tout organe, les premiers éléments conducteurs sont de petit calibre et peu lignifiés : la lignine s'y dépose sous forme d'anneaux et les files de cellules conductrices forment des trachéides annelées.

L'essentiel des parois longitudinales reste cellulosique, donc perméable et déformable, ce qui par conséquent ne nuit nullement à l'achèvement de l'allongement de l'organe concerné, ni à une active circulation latérale (en particulier, au niveau de la zone pilifère de la racine).

Bientôt, à côté des trachéides annelées, de nouvelles files de cellules procambiales s'organisent en trachéides spiralées avec des épaississements internes de lignine en forme de spirale, laissant, là aussi, des plages cellulosiques encore aptes à l'allongement.

Ces trachéides annelées et spiralées, organisées en séries verticales, conservent leurs parois transversales ou obliques et forment le xylème primitif, le protoxylème.

La coloration (technique de la double coloration)

Au fur et à mesure de la confection des coupes, les transporter grâce à une aiguille lancéolée (la pince est à proscrire) ou un petit panier spécial, dans une série (ou « batterie ») de verres de montre contenant successivement *(fig. 21.17)* :

– de l'hypochlorite de soude (5 à 10 minutes) qui détruit le cytoplasme vivant des cellules et révèle mieux les parois squelettiques (bain à surveiller pour éviter la destruction de l'échantillon). Toutefois si l'éclaircissement des coupes n'est pas suffisant, chauffer légèrement la solution ;
– de l'eau distillée pour un lavage à grande eau, autrement dit un rinçage, car un reste d'hypochlorite détruirait les colorants ;
– de l'acide acétique à 10 % (3 à 5 minutes) : les coupes continuent à perdre leur hypochlorite et les tissus deviennent plus aptes à bien fixer leur colorant (mordançage) ;
– du vert d'iode acétique (1 à 5 secondes) : les coupes sont alors uniformément colorées en vert ;
– de l'alcool à 90° : les coupes qui y sont déposées sont l'objet d'une régression de coloration ; on les y laisse jusqu'à ce que l'alcool à 90° n'enlève plus de vert ;
– de l'eau distillée : simple passage des coupes ;
– du carmin aluné (5 à 10 minutes) qui colore les parois squelettiques demeurées cellulosiques en rose alors que le vert d'iode teinte les parois lignifiées, cutinisées et subérifiées en vert, en bleu vert ou en violet suivant le degré de modification de la paroi colorée ;
– de l'eau distillée pour un dernier lavage à grande eau, afin d'éliminer l'excès de colorant ; les préparations sont prêtes au montage.

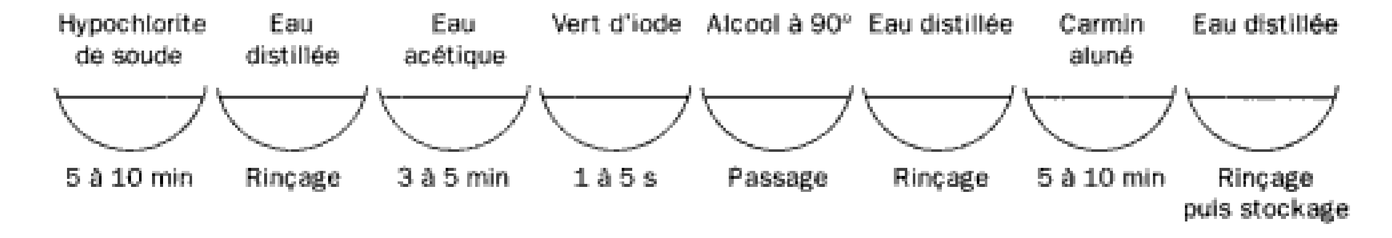


Figure 21.17. Technique de la double coloration. La batterie des verres de montre.

Remarque : en vue de simplifier la manipulation précédente, on peut aussi faire agir simultanément les deux colorants précédents en les mélangeant : c'est utiliser le réactif au carmino-vert de Mirande (mélange renfermant dix parties de carmin aluné et une partie de vert d'iode).

Utiliser ce réactif de la manière suivante :

– bain d'hypochlorite de sodium (5 à 10 minutes) ;
– passage à l'eau acétique ;
– bain de carmino-vert (5 à 10 minutes) ;
– lavage à l'eau distillée ;
– montage éventuel à la glycérine.

La coloration est obtenue plus rapidement, mais elle s'avère moins fine qu'avec la méthode des bains successifs.

Ensuite, transporter les coupes d'un verre de montre dans le suivant à l'aide de l'aiguille lancéolée exclusivement ; sinon, faire progresser le « panier » contenant les diverses

coupes réalisées, dans la série de verres de montre. Après le dernier lavage, le renverser sur un verre de montre vide et jeter l'eau d'un autre verre de montre sur le fond pour en détacher les coupes. Si on les enlève soi-même dans les mailles du panier, on les altère.

Se méfier également de la moindre goutte d'hypochlorite transportée par l'aiguille lancéolée ou le panier. Laver abondamment ces instruments avec l'eau acétique ; en effet, la moindre trace de chlorure décolorant ramène les couleurs obtenues au vert-jaune.

■ ***Le montage***

La coloration effectuée, ne monter que 2 ou 3 coupes sous une même lamelle et jamais plus d'une lamelle par lame.

Le plus simple est de monter les meilleures coupes, bien transversales ou longitudinales et non obliques, entre lame et lamelle dans une goutte d'eau ou de glycérine diluée.

Remarque : dans ce but, la lamelle dont le bord inférieur est au contact de la lame est amenée au contact de la goutte de liquide puis rabattue lentement sur cette goutte à la manière d'un volet. Cette façon de procéder permet d'éviter la formation de bulles d'air dans la préparation, fort gênantes pour l'observation.

Ne jamais appuyer sur la lamelle avec les doigts.

Les très bonnes coupes aux contours cellulaires nets et bien colorés mériteront d'être conservées plus durablement avec un montage en gélatine glycérinée.

On dépose sur la lame un petit fragment de cette gélatine que l'on fait fondre sur une platine chauffante ; on transporte dans le mélange fondu les coupes placées au préalable dans l'eau distillée.

On recouvre d'une lamelle et on laisse refroidir avec un montage dans le baume du Canada.

Les coupes doivent d'abord être soigneusement déshydratées par un passage dans l'alcool à 90° puis deux séjours successifs dans l'alcool absolu. Elles sont ensuite placées dans du toluène qu'elles ne doivent pas troubler (sinon, il convient de déshydrater à nouveau par l'alcool absolu).

On dépose ensuite sur la lame une ou deux gouttes de solution de baume du Canada dans du toluène. On transporte alors les coupes dans ce liquide. On recouvre d'une lamelle et on laisse sécher à l'air.

Résultats, observations et interprétation

■ ***Examen des coupes transversales***

La symétrie axiale est caractéristique de la tige. A l'objectif 4, réaliser un croquis localisé à un secteur montrant un contour sinueux et la présence de petits faisceaux de tissus conducteurs dans les carènes et des faisceaux plus importants dans les vallécules.

Schématiser l'un d'eux : deux plages roses de part et d'autre d'un massif vert, autrement dit, deux masses de phloème entourent un massif de xylème *(fig. 21.18)*.

Classiquement, les tiges ne contiennent que du phloème externe par rapport au massif ligneux. Les Cucurbitacées se singularisent par la présence de phloème primaire « interne » ou phloème périmédullaire *(fig. 21.19)*.

Ce petit inconvénient d'observation est aisément compensé par la grande dimension des tubes criblés permettant de bien voir les cribles.

Dans un massif de phloème externe, le protophloème et le métaphloème se présentent avec des tubes criblés de diamètre croissant.

A l'objectif 4, repérer, dans le phloème externe d'un volumineux faisceau conducteur, un élément qui semble obstrué ; on ne distingue pas le crible, mais cette « obstruction » nous assure de sa réalité.

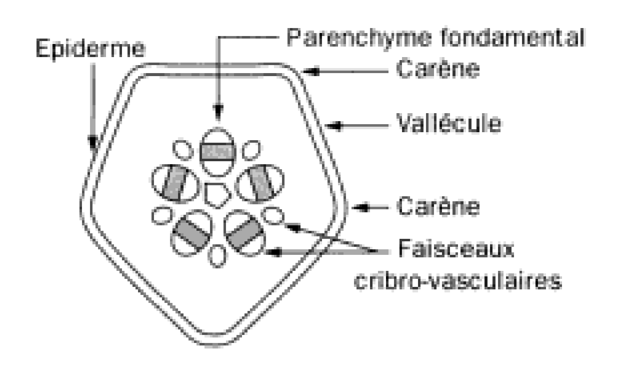


Figure 21.18. Coupe transversale de tige de Cucurbitacée (× 12).

Trachéides
Arc de cambium intra-fasciculaire
Phloème interne
Phloème externe
Vaisseaux rayés
Vaisseaux réticulés Vaisseaux ponctuels

Figure 21.19. Organisation d'un massif cribro-vasculaire de tige de Cucurbitacée.

A l'objectif 10, on aperçoit le crible, entier ou non, mais ayant une mise au point légèrement différente de celle du parenchyme voisin.

Dessiner d'abord les contours cellulaires, puis installer le crible dans un des tubes criblés dessinés.

Au point de vue vasculaire, la coupe transversale renseigne peu. Elle signale des éléments ligneux de calibre dont l'épaississement lignifié paraît uniforme : respectivement, on reconnaît le protoxylème avec des trachéides annelées et spiralées et le métaxylème doté de véritables vaisseaux (rayés, réticulés et ponctués).

Entre les deux tissus primaires, un arc de cambium intrafasciculaire commence à édifier des tissus conducteurs secondaires (bois et liber).

■ ***Examen de coupes longitudinales***

Mêmes fragmentaires, ces coupes mettent en évidence la succession et l'ornementation des trachéides et vaisseaux du xylème. Ne pas chercher tous les types d'éléments conducteurs sur la même coupe. Echantillonner chaque type lorsqu'il se présente, mais respecter leur ordre et leur calibre ainsi que le parenchyme adjacent *(fig. 21.20)*.

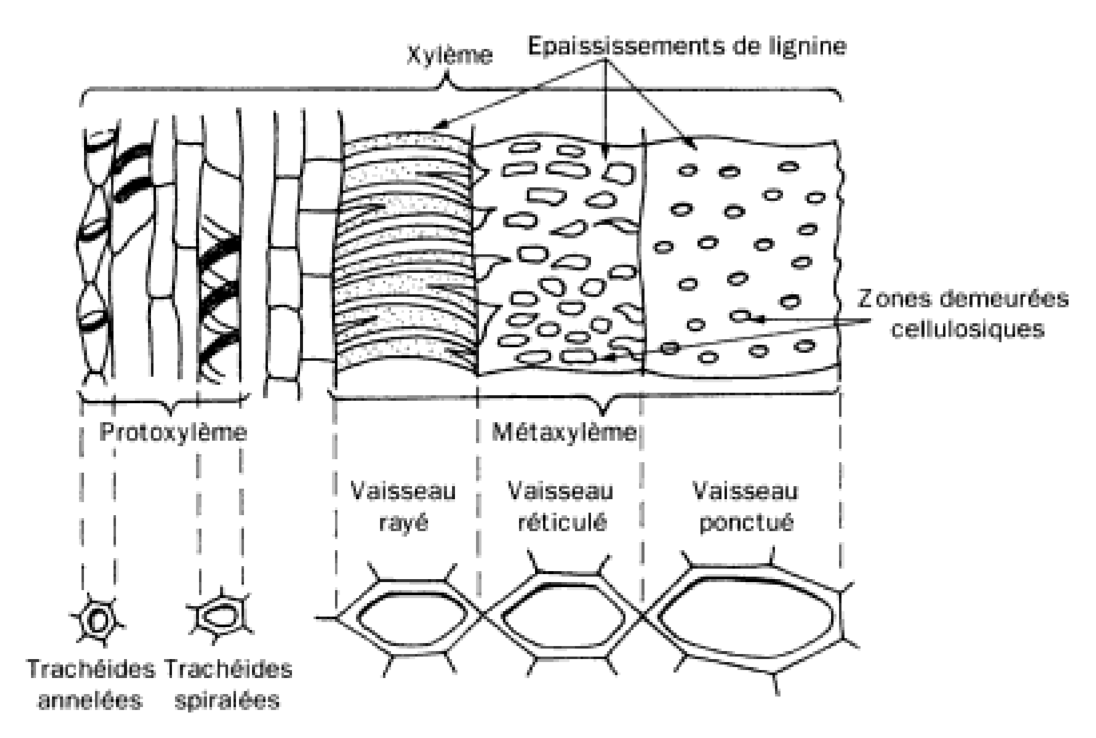


Figure 21.20. Les constituants d'un massif de xylème (× 600).

Quant au phloème, il peut être identifié de la manière suivante *(fig. 21.21)* : il est bien coloré en rose, car cellulosique. Ses éléments de grand diamètre ont des parois longitudinales épaissies, associées à des cellules parenchymateuses courtes à parois minces. Un dépôt de callose obstrue quelques cribles.
Dans une région favorable, déplacer la préparation parallèlement à l'allongement des tubes criblés et dessiner un ou deux d'entre eux avec un crible sectionné, un crible en perspective.

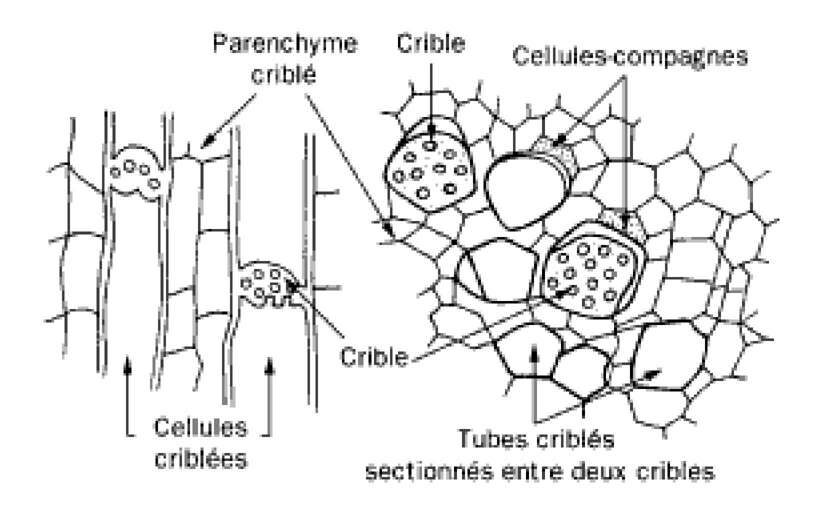
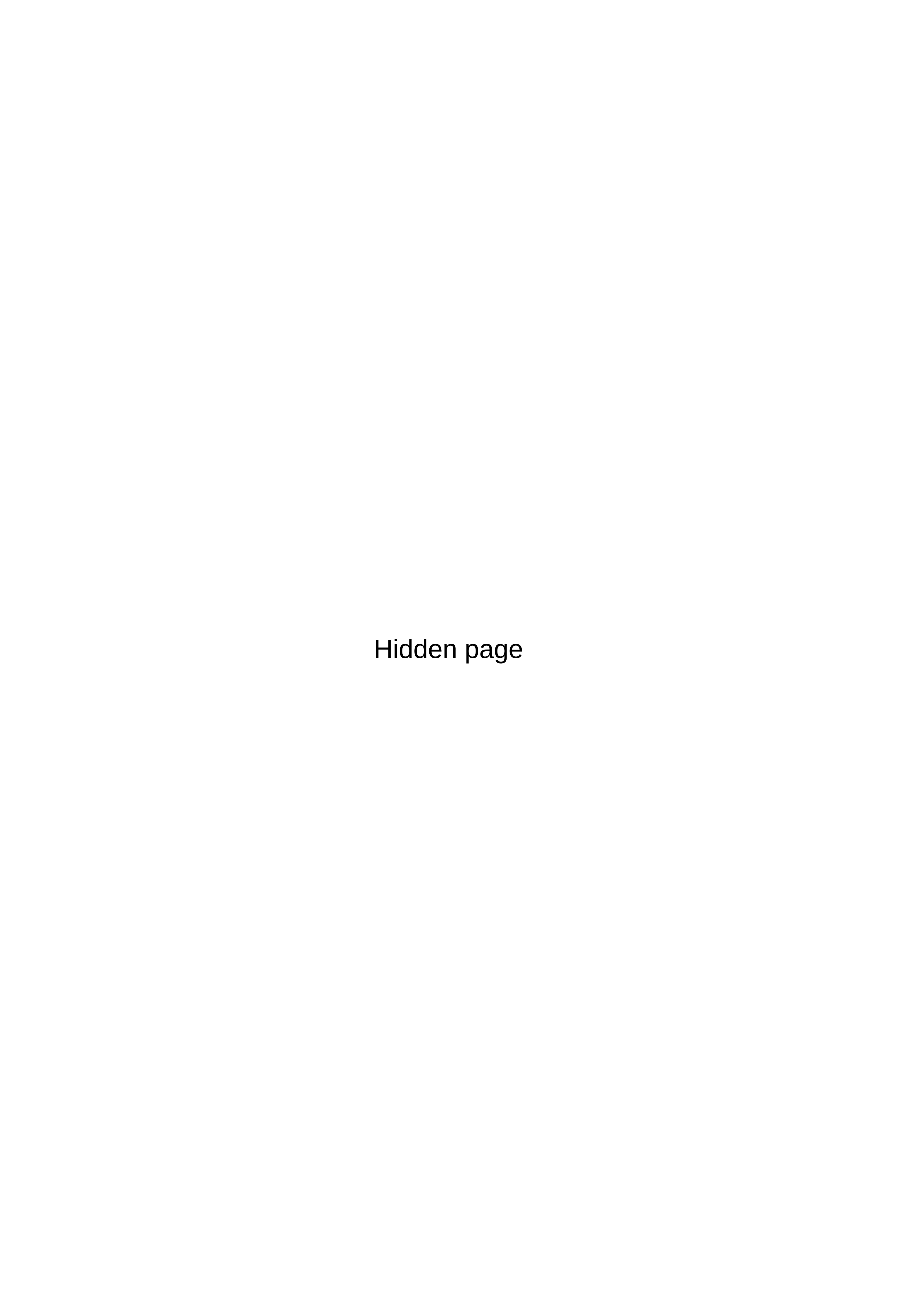


Figure 21.21. Les tubes criblés du phloème (× 600).

Conclusion

Xylème et phloème sont des tissus caractéristiques des Végétaux vasculaires ou Trachéophytes (Ptéridophytes, Gymnospermes, Angiospermes). Leur présence sert de trait d'union entre les diverses régions aériennes et souterraines, souvent fort éloignées les unes des autres, au sein de l'organisme végétal.
Les tissus conducteurs et les autres tissus ont contribué à l'installation de ces végétaux sur les terres émergées avec une mention particulière pour les Angiospermes qui, par leur diversité morphologique (végétaux ligneux et herbacés) et biologique (végétaux annuels, bisannuels et vivaces), dominent la flore terrestre actuelle.


Hidden page

Mode opératoire

Faire « germer » un bulbe d'oignon (ou de jacinthe) sur un verre d'eau, à une température moyenne de 16 à 20 °C *(fig. 21.22)*. Les bulbes germent bien s'ils ont passé l'hiver dans un lieu froid. Sinon, les maintenir pendant quelques semaines dans un réfrigérateur.

Dix jours plus tard, les premières racines peuvent être prélevées. Sectionner les extrémités des jeunes racines (les 6 derniers mm) et les placer dans une coupelle contenant du carmin acétique. Celui-ci est à la fois un fixateur (par l'acide acétique) et un colorant (par le carmin).

Porter à l'ébullition pendant 1,5 minute.

Monter un exemplaire entre lame et lamelle dans une goutte de réactif. Si nécessaire, appuyer très doucement sur la lamelle de façon à dissocier les cellules sans les écraser.

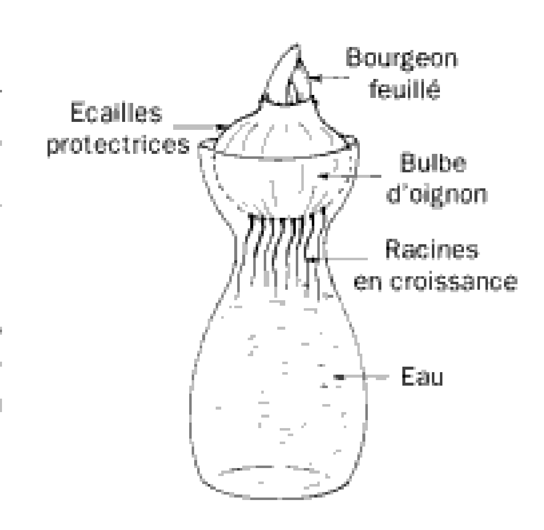


Figure 21.22. L'enracinement d'un bulbe d'oignon.

Trouver le méristème à proximité de la pointe de la racine, avec ses petites cellules régulières et isodiamétriques.

Les noyaux peuvent se rencontrer sous deux états : certains sont au repos mitotique, d'autres sont en cours de mitose.

Résultats, observations et interprétation

La division cellulaire ou mitose reconnaît quatre phases successives (prophase, métaphase, anaphase, télophase), d'inégale durée mais à déroulement continu *(fig. 21.23)*. Dans un but de clarification, on « sépare » ces phases de la façon suivante.

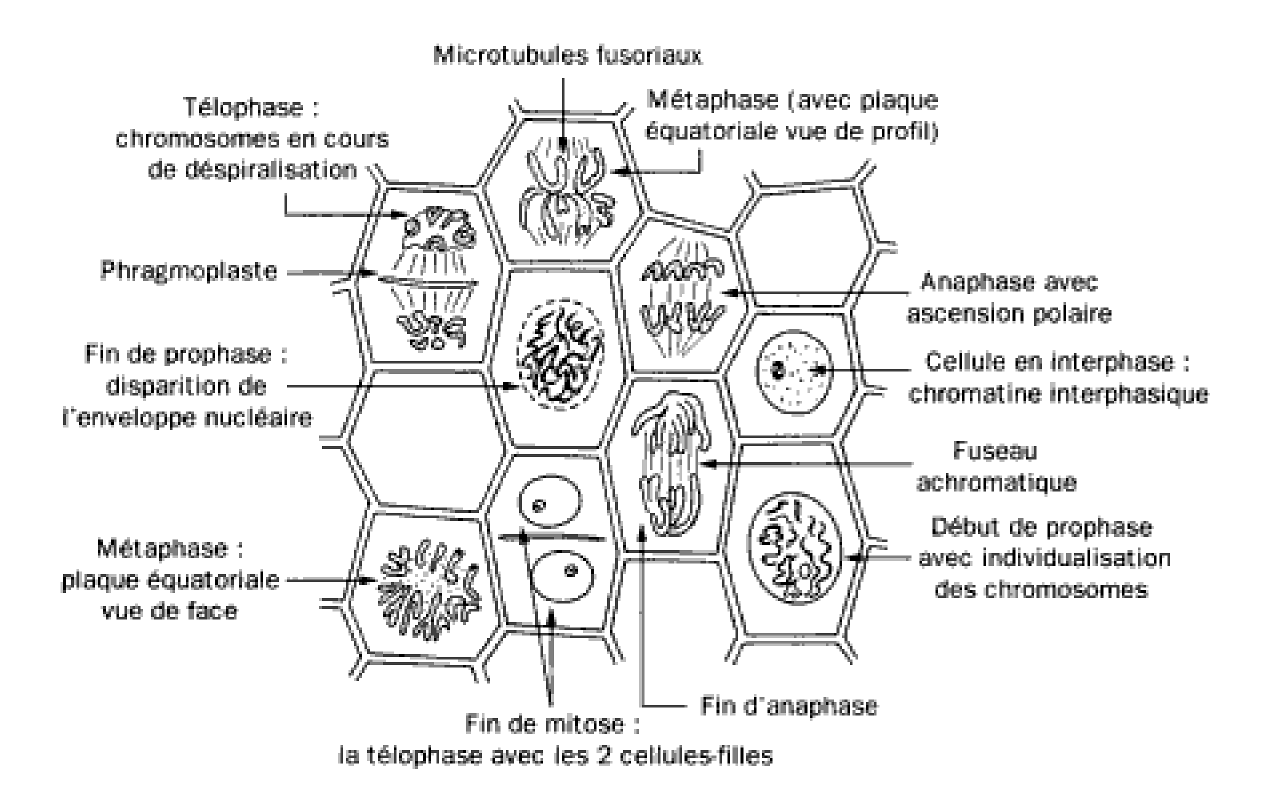


Figure 21.23. Fragment de méristème : les phases de la mitose végétale.

9. Les vacuoles à coloration variable

Mots clés

Pigment, vacuole, anthocyanes, pH, perméabilité.

Principe

Des pigments comme les anthocyanes contenus dans les vacuoles végétales changent de coloration en fonction du pH dans lequel elles sont plongées.

Sécurité

Cette manipulation ne présente aucun danger.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

Fleur d'anémone cultivée.

■ ***Réactifs***

– Solution d'HCl (0, 5/1 000) définissant un pH de 4 environ.
– Solution d'ammoniaque (1/1 000) définissant un pH de 8 environ.
– Eau distillée.

■ ***Matériel***

– Microscope.
– Lames et lamelles.
– Pinces fines.
– Aiguille lancéolée.
– Compte-gouttes.
– Becher.

Mode opératoire

A l'aide d'une aiguille lancéolée et d'une pince fine, détacher un fragment d'épiderme inférieur d'un pétale de fleur d'anémone. Placer l'échantillon dans une goutte d'eau distillée, les courts poils épidermiques vers le haut. Recouvrir d'une lamelle. Observer.
Puis remplacer, à l'aide d'un compte-gouttes, l'eau distillée par une solution d'HCl très diluée (pH = 4 environ). Observer.
Effectuer ensuite la même manipulation, en utilisant cette fois une solution ammoniacale diluée. Observer.
Variante
Dans une enceinte en verre, disposer un becher contenant une solution ammoniacale. A côté, installer une fleur d'anémone dans un petit récipient rempli à moitié d'eau. Observer.

Résultats, observations et interprétation

Les cellules de l'épiderme inférieur d'un pétale d'anémone cultivée présentent un contour plus ou moins sinueux et leur disposition rappelle celle d'un « jeu de patience » *(fig. 21.24)*.
Une volumineuse vacuole colorée par l'anthocyane occupe pratiquement chaque cellule, repoussant le cytoplasme vers la périphérie. Cependant, observer dans ce cytoplasme pariétal le noyau ovoïde d'aspect granuleux et des leucoplastes (ou plastes incolores).

Ils se présentent alors essentiellement sous la forme de cristaux isolés, de cristaux associés (ou macles) ou de faisceaux de fins cristaux (ou raphides).

– Dans l'épiderme d'oignon *(fig. 21.25)*, il existe une abondance de cristaux prismatiques (« en tablettes ») de section triangulaire ou quadrangulaire surmontés ou non d'une base pyramidale ; certains sont associés en croix de Saint-André.

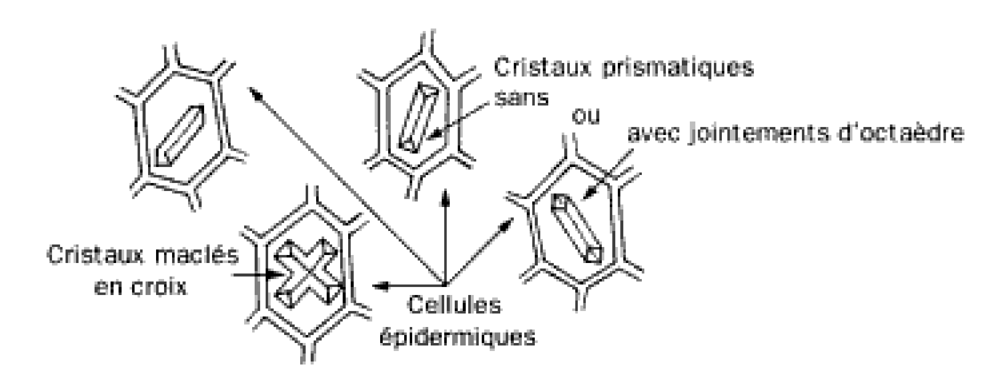


Figure 21.25. Epiderme d'oignon : *Allium cepa* (Liliacées) (× 550).

– Dans le pétiole de lierre *(fig. 21.26)*, observer de volumineux cristaux octaédriques « en oursins », c'est-à-dire dont la convergence produit une concrétion agrémentée de pointes.

Remarquer que les cellules les contenant sont très souvent cloisonnées en deux, quatre jusqu'à huit logettes, de sorte que deux cristaux « maclés » sont rarement dans un seul compartiment. Ce fait d'observation, quoique non encore expliqué, permet de reconnaître des cellules « à oursins » même si elles en sont vidées par la lame de rasoir au moment de la coupe ou par l'hypochlorite ensuite.

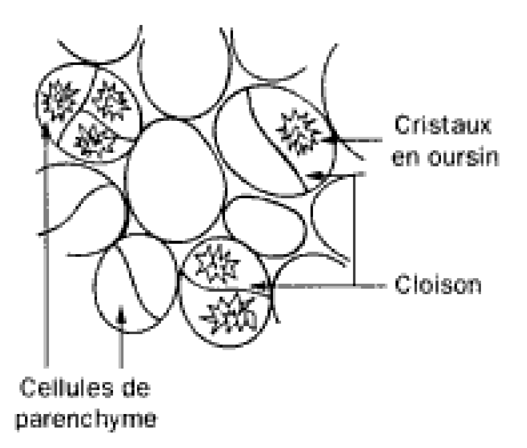


Figure 21.26. Pétiole de lierre : *Hedera helix* (Araliacées) (× 750).

– Chez l'asperge *(fig. 21.27)*, les raphides sont de longues aiguilles prismatiques placées parallèlement entre elles dans les vacuoles, y formant des faisceaux disposés selon le grand axe des cellules.

A l'objectif 4, les raphides apparaissent comme des amas grisâtres. A l'objectif 10 orienté sur l'un d'eux, on observe des aiguilles en faisceaux dans les cellules allongées en files régulières.

Certains groupements, disjoints au moment de la coupe, permettent de vérifier que les raphides sont prismatiques à extrémités pointues.

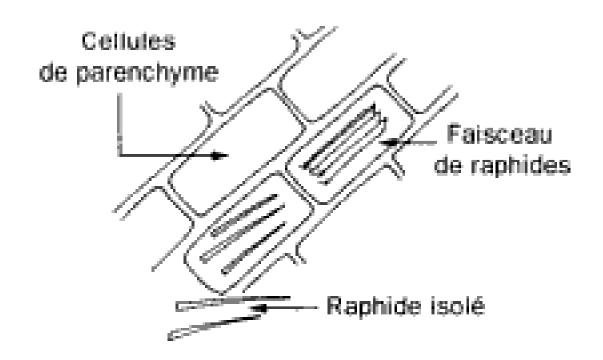


Figure 21.27. Racine d'asperge : *Asparagus officinalis* (Liliacées) (× 700).

Les raphides s'installent dans les vacuoles de cellules renfermant des mucilages ; elles sont surtout abondantes chez les Monocotylédones.

■ ***Les cristallisations de carbonate de calcium***

Le carbonate de calcium peut imprégner et rigidifier les parois des cellules végétales, en particulier chez les Thallophytes (algues encroûtantes, etc.) ; mais chez les végétaux supérieurs, quelques familles d'Angiospermes présentent aussi des dépôts volumineux et caractéristiques.

Ainsi, dans le mésophylle du limbe de la feuille du figuier, plus précisément dans l'hypoderme, situé sous l'épiderme supérieur, observe-t-on des concrétions cystolithiques de $CaCO_3$ de forme caractéristique *(fig. 21.28)*, suspendues par un court prolongement au plafond de cellules volumineuses spécialisées du parenchyme foliaire.

Ces cystolithes prennent naissance à partir d'un appendice de la paroi squelettique qui fait une saillie dans la cavité cellulaire, servant ainsi de support aux nodules solides de $CaCO_3$.

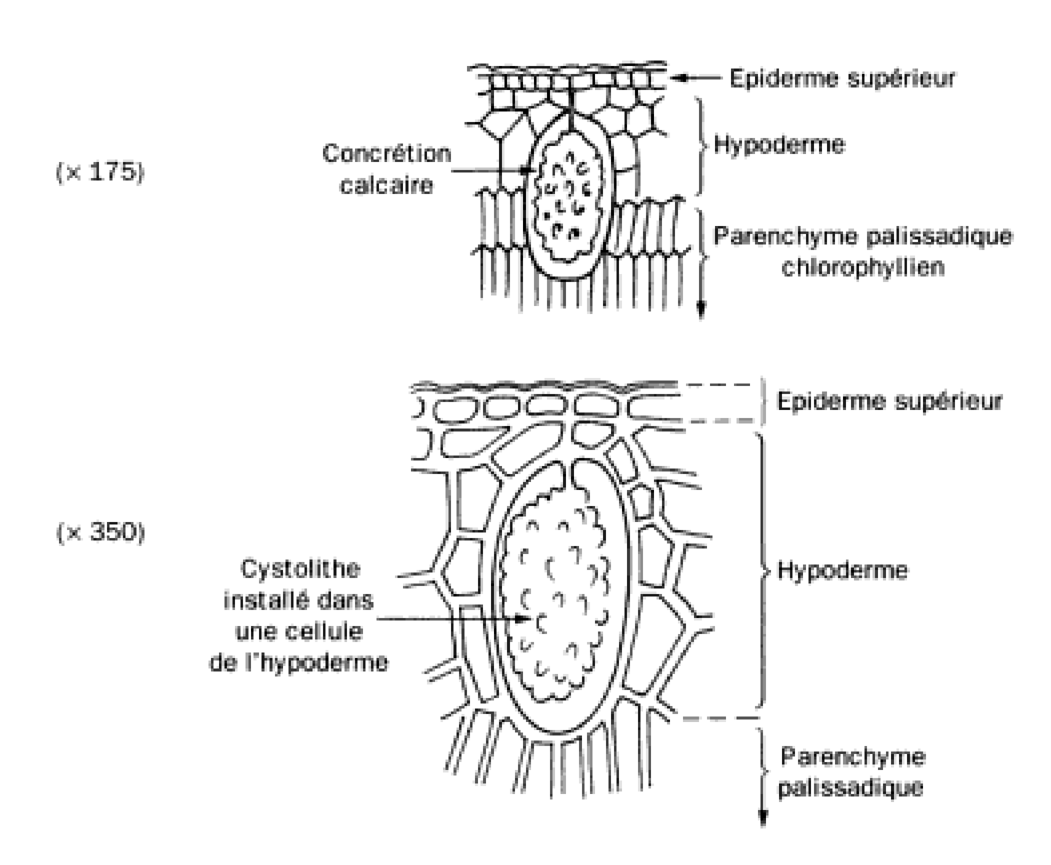


Figure 21.28. Coupe fragmentaire du limbe de la feuille de *Ficus elastica* : le « caoutchouc des fleuristes » (Moracées).

Conclusion

La présence et la nature des cristallisations dans un organe des végétaux supérieurs sont, au niveau microscopique, des critères non négligeables dans la diagnose végétale.

2. L'épiderme de grenouille

Mots clés

Epiderme, tissu, amphibien.

Principe

Par définition, les tissus épithéliaux assurent un rôle de revêtement protecteur (voir IV.22.1). Par la suite, certaines cellules épithéliales développent des propriétés sécrétrices et deviennent des cellules glandulaires définissant une variété de tissus épithéliaux, les épithéliums glandulaires.
Les données concernant l'épiderme buccal se retrouvent au niveau du tégument d'un vertébré amphibien, la grenouille.

Sécurité

Cette manipulation ne présente aucun danger.

Matière d'œuvre

■ *Matériel biologique*

Fragments de « mues » de grenouilles à récolter dans le paludarium où on élève des grenouilles (*Rana esculenta* ou *Rana temporaria*, Amphibiens).

■ *Réactifs*

Solution iodo-iodurée (voir I.2.1) ou solution de bleu de méthylène.

■ *Matériel*

- Microscope.
- Pinces fines.
- Lames et lamelles.
- Deux aiguilles droites.
- Scalpel.
- Gants latex jetables.
- Lunettes de protection.

Mode opératoire

Dans l'eau du paludarium au sein de laquelle des grenouilles (ou autres amphibiens : des tritons, etc.) se sont agitées, flottent des lambeaux minces, grisâtres et translucides atteignant parfois plusieurs centimètres de longueur : ce sont des « mues » de grenouilles.
Etaler un fragment frais de « mue » sur une lame portant une goutte d'eau et recouvrir d'une lamelle. Observer au microscope.
Faire un deuxième montage en utilisant une goutte d'une solution iodo-iodurée ou d'une solution de bleu de méthylène. Observer au microscope.

■ *Autre manipulation possible*

Gratter avec un scalpel la peau du dos d'une grenouille, là où se trouve une tache noire et, avec des aiguilles montées, dilacérer les fragments détachés dans une goutte d'eau salée.
La dilacération a pour but de séparer les éléments les uns des autres pour en faciliter l'observation.

Rechercher un « carrelage » de grandes cellules. Ce sont les cellules superficielles de l'épiderme (voir la manipulation ci-dessus) : cellules jointives, de forme polygonale, et aplaties (d'où l'expression d'épithélium pavimenteux), avec un noyau net et un cytoplasme à granulations brunâtres. Les dessiner.
Dans la même préparation, ailleurs, retrouver des cellules semblables aux précédentes, jointives elles aussi, mais plus petites. A l'aide de la vis micrométrique, elles apparaissent plus hautes que larges : ce sont les cellules profondes de l'épiderme. Les dessiner.

Résultats, observations et interprétation

Au faible, puis au fort grossissement, l'épithélium pavimenteux se révèle formé d'un ensemble de cellules jointives, polygonales, au noyau bien visible au sein d'un cytoplasme granuleux.
Entre les cellules de l'épiderme, observer les orifices des glandes à mucus, à disposition assez régulière. Ces orifices se présentent comme des espaces arrondis au centre desquels on aperçoit une ouverture à trois lèvres *(fig. 22.3)*.

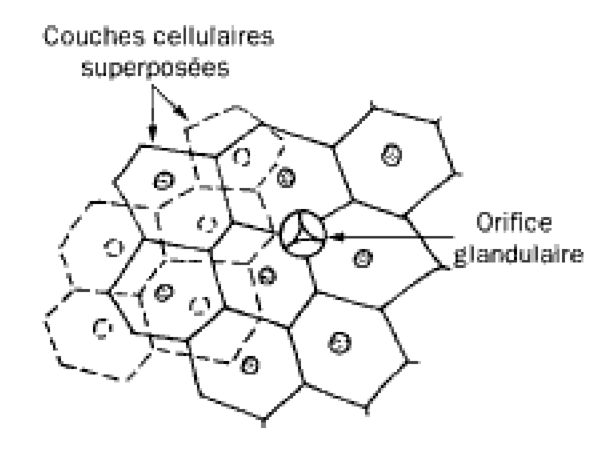


Figure 22.3. Fragment de mue de grenouille (Amphibiens).

L'examen du montage coloré à l'iode ou au bleu de méthylène confirme les données précédentes.
Comme chez tous les vertébrés, l'épiderme est pluristratifié : les cellules profondes, au contact du derme vascularisé, sont vivantes et se renouvellent par mitoses à partir de la couche germinative tandis que les couches cellulaires externes sont mortes et desquament en lambeaux *(fig. 22.4)*.
L'échantillon peut montrer également, pour peu qu'on ait gratté la peau de la grenouille assez fort, les cellules pigmentaires ou chromatophores du derme sous-jacent.
Ce sont des cellules fortement colorées par les granulations d'un pigment noir (la mélanine), de forme très variable : elles sont constituées d'un corps cellulaire arrondi émettant des prolongements plus ou moins nombreux, plus ou moins grêles et plus ou moins ramifiés. Le corps cellulaire montre un noyau apparaissant sous forme d'une tache claire *(fig. 22.5)*.
Ces chromatophores, à la manière d'une amibe émettrice de pseudopodes, changent sans arrêt d'aspect : rétractant leurs pseudopodes, ils couvrent une surface peu étendue, mais ils peuvent aussi s'étaler largement.
Ils contribuent à varier la teinte du tégument de la grenouille de manière à mettre sa coloration en harmonie

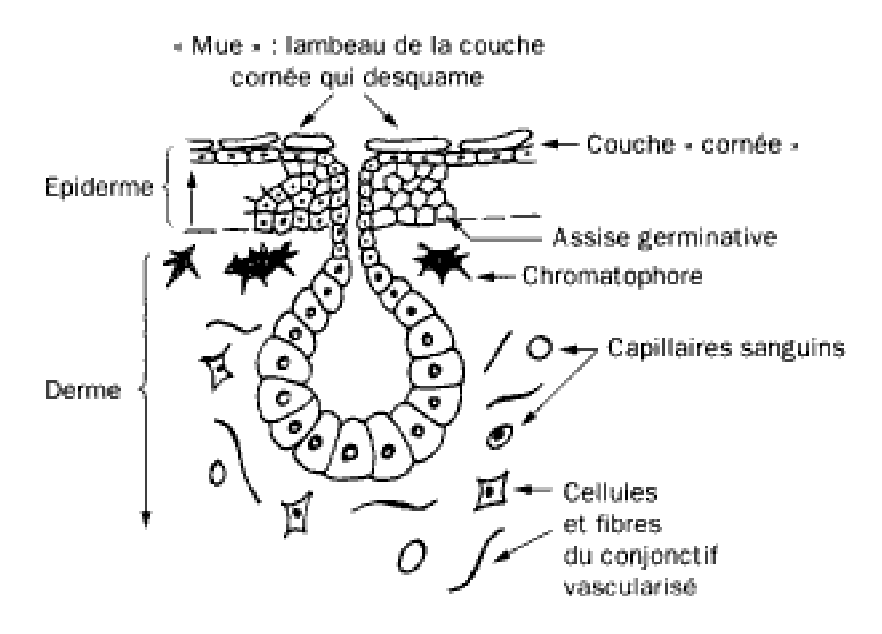


Figure 22.4. Tégument d'un amphibien.

avec le milieu extérieur et à la camoufler.

Ces cellules sont, comme les autres composants du derme, non jointives, séparées par une substance fondamentale ; cette organisation traduit une nature conjonctive et non plus épithéliale.

Dessiner quelques chromatophores.

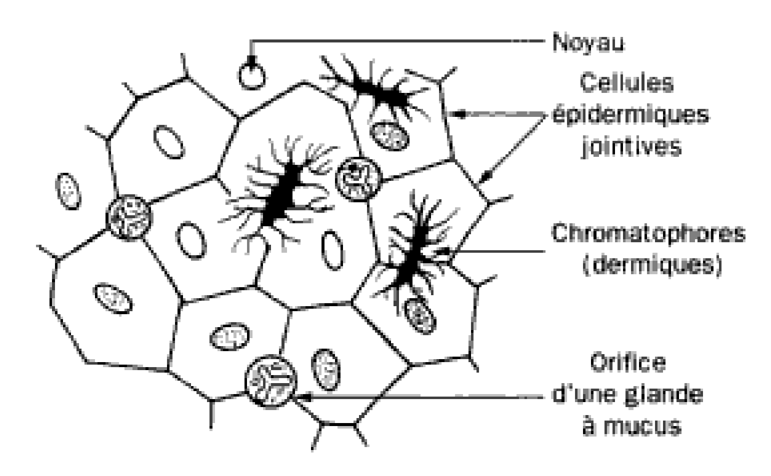
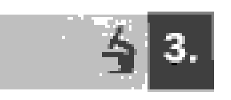


Figure 22.5. Fragment d'épiderme de grenouille (Amphibiens).

Conclusion

La « mue » de la grenouille correspond à la fine couche cornée épidermique. Sa présence traduit un premier pas dans l'adaptation au milieu aérien desséchant, en rapport avec la vie mi-aquatique et mi-terrestre que mènent les amphibiens.

La couche épidermique cornée prend beaucoup plus d'importance chez les Vertébrés amniotes franchement terrestres (reptiles, oiseaux et mammifères) participant également à la constitution des phanères (plumes des oiseaux, poils, griffes, sabots des mammifères, etc.).



3. L'épithélium cilié d'un mollusque lamellibranche

Mots clés

Epithélium, mollusque lamellibranche, branchie, eau de mer.

Principe

Les cellules épithéliales de recouvrement présentent parfois des différenciations qui leur confèrent des activités originales au sein de l'organisme ; il en est ainsi pour les épithéliums ciliés.

Sécurité

Cette manipulation ne présente aucun danger.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***
- Moule.
- Huître ou autre lamellibranche à l'état vivant.

■ ***Réactifs***
- Encre de Chine.
- Eau iodée.

■ ***Matériel***
- Microscope.
- Lames et lamelles.
- Ciseaux fins.
- Pinces fines.
- Aiguille droite.
- Compte-gouttes.
- Couteau à forte lame.

Mode opératoire

Ouvrir une moule (ou autre mollusque lamellibranche commun), après avoir glissé une lame de couteau en la tenant à plat pour couper les muscles adducteurs antérieur et postérieur.
Des branchies en forme de lamelles flottent dans la cavité palléale.
Prélever avec des ciseaux fins un morceau de lamelle branchiale. Avec la pointe d'une aiguille montée, le dilacérer doucement sur une lame de verre et le monter ensuite dans une goutte d'eau de mer prélevée dans la cavité palléale de l'animal : les cellules branchiales, maintenues dans leur milieu originel, continuent à vivre.
Observer, au fort grossissement du microscope, la forme allongée des filaments branchiaux et leurs relations réciproques : ils portent, sur toute leur longueur, une multitude de cils vibratiles, continuellement en mouvement.
Déposer une goutte d'eau iodée sous un « coin » de la lamelle : il se produit une paralysie qui permet de mieux analyser le mouvement coordonné des cils par ondes successives. Le colorant tue progressivement les cellules qu'il touche. Apercevoir la base centriolaire des cils vibratiles dans les cellules mortes.
Isoler un deuxième échantillon de branchie et le monter dans une goutte d'eau de mer additionnée d'encre de Chine diluée. Observer et dessiner.

Le déplacement rapide des particules en suspension, et souvent des Protozoaires commensaux, concrétise le courant d'eau animé par les battements ciliaires *(fig. 22.9)*. Ceux-ci expliquent les courants liquides rendus visibles par les particules d'encre de Chine de la dernière manipulation.
Observer les mouvements ciliaires vers l'extérieur des filaments.
Les cils qui bordent chacune des lamelles branchiales déterminent une circulation d'eau indispensable à la vie de la moule : ainsi, à marée haute, ce courant d'eau de mer (plus de 70 litres par jour) entre dans la cavité palléale par une large ouverture ventrale (entre les deux lobes du manteau ou pallium), baigne les organes et ressort par une ouverture postérodorsale, la boutonnière *(fig. 22.10)*.

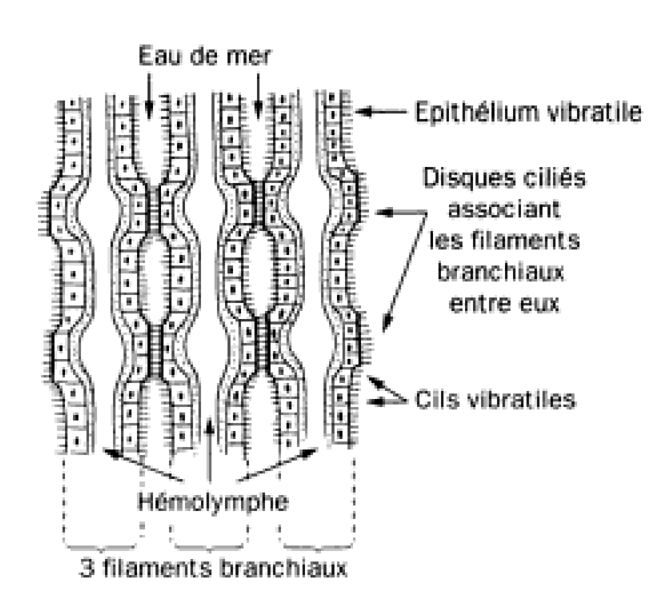


Figure 22.9. Fragment de branchie observé au microscope.

Au cours de ce trajet, l'eau mise en mouvement permet les échanges respiratoires au niveau de la vaste surface d'échanges réalisée par les branchies en lamelles, conduit les particules alimentaires (plancton, etc.) à proximité de la bouche et des palpes buccaux (la moule a en effet un régime alimentaire microphage), évacue les déchets rejetés par l'intestin et les reins vers la boutonnière et, en période de reproduction, permet aux produits sexuels de se rencontrer pour assurer la continuité de l'espèce.

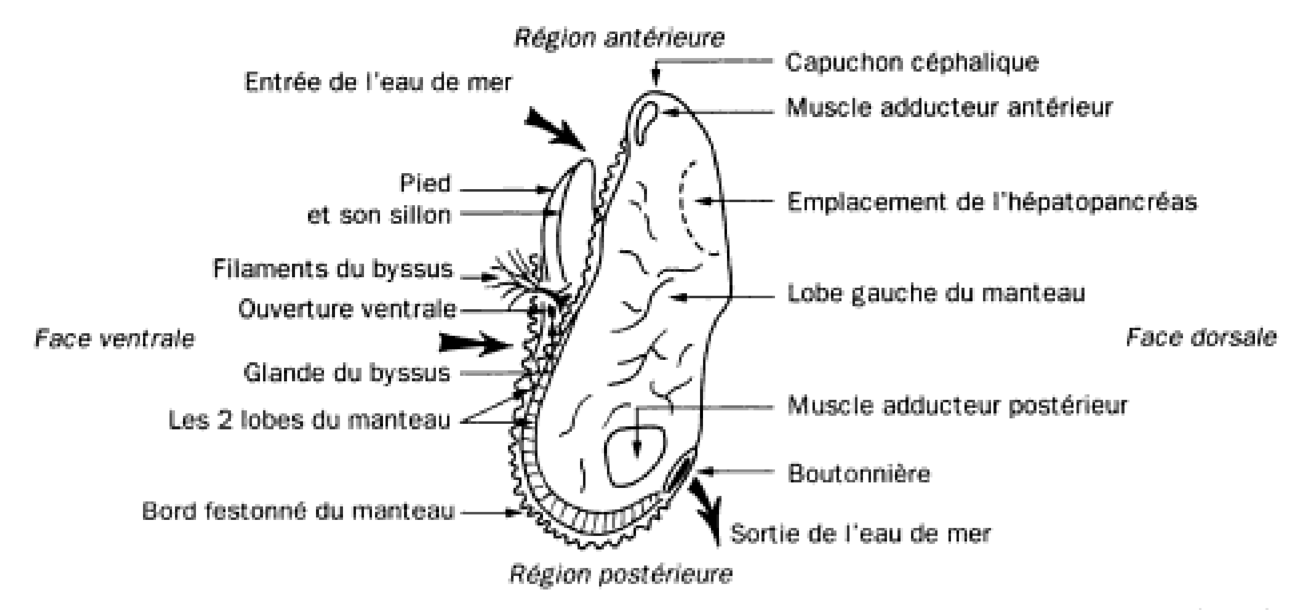


Figure 22.10. La moule débarrassée de sa coquille : circulation de l'eau de mer réalisée grâce aux mouvements ciliaires.

Conclusion

La moule, comme beaucoup de mollusques lamellibranches, mène une vie aquatique pratiquement fixée. La ciliature par ses battements crée une circulation de l'eau de mer indispensable aux échanges avec son environnement. Sa modeste vie de relation, sa vie de nutrition et, épisodiquement, sa vie de reproduction en dépendent directement.

4. Les constituants sanguins de la grenouille

Mots clés

Sang, tissu conjonctif, érythrocyte, leucocyte, frottis.

Principe

Le sang est considéré comme un tissu conjonctif dont la substance fondamentale liquide, le plasma, contient des cellules libres, les éléments figurés.

Sécurité

D'après le décret du 19/10/87 et l'arrêté d'application du 19/04/88, cette manipulation est réservée à l'enseignement supérieur et doit être réalisée par un expérimentateur titulaire d'un certificat nominatif d'habilitation à l'expérimentation animale dans un établissement agréé.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

Sang frais de grenouille rousse *(Rana temporaria)* ou de grenouille verte *(Rana esculenta)*.

■ ***Réactifs***

– Fixation à l'alcool méthylique absolu.
– Coloration au May-Grünwald-Giemsa.

■ ***Matériel***

– Microscope.
– Lames et lamelles.
– Gants latex jetables.
– Lunettes de protection.

Mode opératoire

Déposer une petite goutte de sang, obtenue à la suite d'une très légère piqûre, sur une lame de verre propre, puis glisser dans cette goutte le bord d'une lamelle obliquement tenue à 45° *(fig. 22.11)*. Sécher en agitant la lame. Le frottis obtenu est fixé par de l'alcool méthylique absolu, puis coloré par le mélange de May-Grünwald-Giemsa.
Observer au fort grossissement. Dessiner.

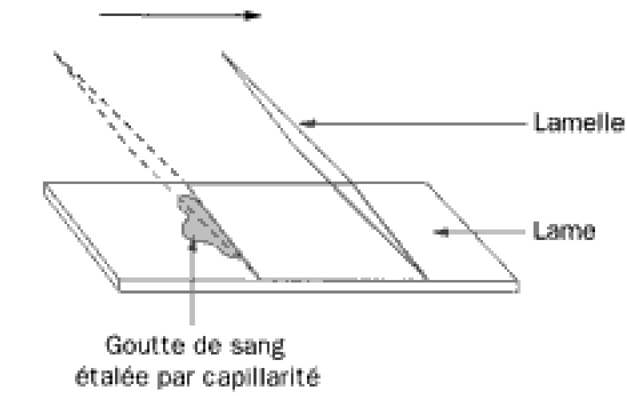


Figure 22.11. Réalisation d'un frottis sanguin.

Résultats, observations et interprétation

Les globules rouges ou érythrocytes sont grands, elliptiques (22 × 15 μm), biconvexes et nucléés, colorés en rouge, leur noyau en violet. Ils forment la très grande majorité des cellules du frottis *(fig. 22.12)*.

Les globules blancs sont beaucoup moins nombreux, 50 fois moins que les globules rouges :
- les granulocytes ou polynucléaires (10 à 12 µm) représentent un quart des globules blancs. Ils offrent, autour de leur noyau plurilobé, 3 aspects correspondant à autant de types cellulaires :
  - éosinophiles à granulations rouges ;
  - basophiles à granulations bleu foncé ;
  - neutrophiles à granulations violet pâle ;
- les lymphocytes, petits (6 à 8 µm), ont un noyau arrondi teinté en violet entouré de fort peu de cytoplasme ;
- les monocytes, plus volumineux, présentent un noyau réniforme.

Lymphocytes et monocytes sont des globules mononucléaires constituant les trois quarts de la population des globules blancs.

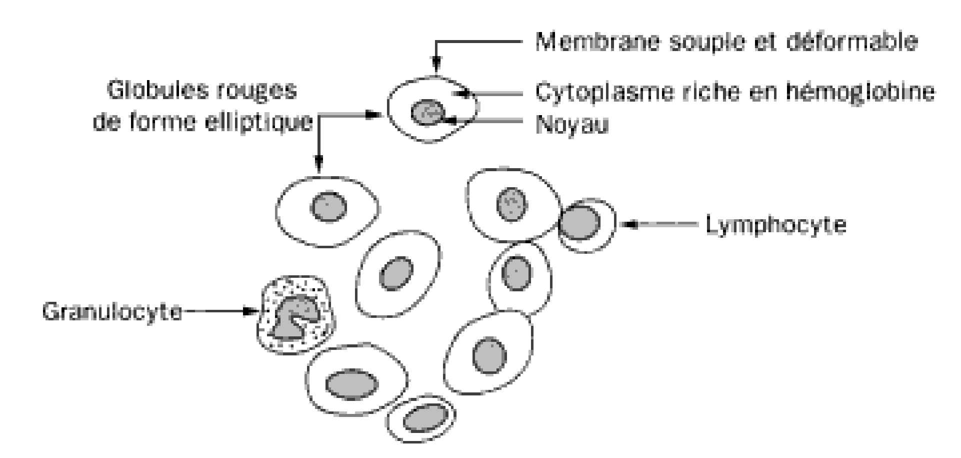


Figure 22.12. Sang de la grenouille (Amphibiens).

Conclusion

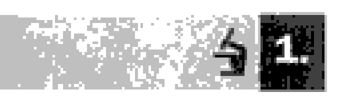
Diversité des cellules sanguines et unité au sein des Vertébrés.



Les phénomènes d'osmose

Sommaire

Page



Propriétés osmotiques des hématies de cheval ou de lapin

Mots clés

Osmose, plasmolyse, turgescence, hémolyse.

Principe

Les hématies sont des cellules anucléées, constituées d'un cytoplasme limité par une membrane plasmique. Dans le sang, elles baignent dans le plasma qui développe la même pression osmotique qu'une solution de NaCl à 9 g/L. Si l'on place des hématies de cheval ou de lapin dans des milieux de concentration variable en NaCl, des mouvements d'eau se produisent que l'on peut apprécier par la taille et la forme des cellules. Les flux d'eau dépendront de la concentration en NaCl de la solution dans laquelle sont immergées les hématies.

Si la concentration est faible (milieu hypotonique par rapport au cytoplasme cellulaire), l'eau entre dans les cellules, celles-ci grossissent et peuvent éclater, elles sont turgescentes. Si la concentration est élevée (milieu hypertonique par rapport au cytoplasme cellulaire), l'eau sort des cellules, celles-ci se « ratatinent », leur taille diminue et leur contour est crénelé. On dit que les cellules sont plasmolysées.

Sécurité

Il est interdit de pipeter le sang à la bouche (utiliser une poire d'aspiration).

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

Sang frais de cheval ou de lapin recueilli en abattoir sur héparine (indiquer la concentration).

■ ***Réactifs***

Solution de NaCl à 20,25 g/L.

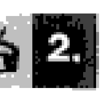
■ ***Matériel***

- Cinq tubes à hémolyse.
- Un portoir pour tubes à hémolyse.
- Une petite centrifugeuse de paillasse (non obligatoire).
- Une pipette graduée de 1 cm^3.
- Deux pipettes graduées de 5 cm^3.
- Une poire d'aspiration.
- Une pipette capillaire.
- Un microscope.
- Lames et lamelles.

Mode opératoire

Préparer dans 5 tubes à hémolyse une gamme de concentration de NaCl, comme il est indiqué dans le *tableau 23.I*, puis introduire, dans chacun des tubes dont le contenu aura été homogénéisé, 0,5 cm^3 de sang frais recueilli sur anticoagulant (héparine).

Centrifuger chacun des tubes durant 5 minutes à 3 000 RPM. A défaut de centrifugeuse, on peut laisser sédimenter durant 24 heures en plaçant à 4 °C au réfrigérateur. Observer le surnageant : il est rouge pour les tubes 0, 1 et 2, incolore pour les tubes 3 et 4.

 2.

L'osmose à l'œuvre dans une racine, un tubercule, une graine, un bulbe, un œuf, une racine artificielle

Mots clés

Osmose, physiologie végétale, turgescence, plasmolyse.

Principe

A l'aide de différents organes végétaux et d'eau sucrée, mettre en évidence les mouvements d'eau par osmose dans les cellules.

Sécurité

Cette expérience ne présente aucun danger.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***
- Carottes.
- Pommes de terre.
- Oignon rouge.
- Haricots secs.
- Œuf de poule.

■ ***Réactifs***
- Sucre en poudre.
- Sirop coloré pour boisson fruité.

■ ***Matériel***
- Six tubes de verre de 5 mm de diamètre.
- Une bougie.
- Six petits bouchons en caoutchouc percés au centre d'un trou de 5 mm.
- Plâtre.
- Une petite boîte en carton de 10 cm x 5 cm environ.
- Lames et lamelles et un microscope grossissant au moins 100 fois.
- Un verre de table.
- Six bocaux de verre.
- Une pince fine.
- Une épingle.
- Un vide-pommes.
- Une pipette.
- Six tubes de verre ou chalumeaux à boisson de 5 mm de diamètre.
- Une cartouche vide de stylo à encre.
- Un tube transparent vide de stylo à bille.
- Un petit bracelet élastique.
- Un morceau de vraie cellophane.
- Un film plastique transparent pour protéger les aliments.

Mode opératoire

1. Choisir trois carottes et trois pommes de terre assez grosses dans leur partie supérieure et dépourvues de crevasses. A l'aide d'un vide-pommes, évider sur une profondeur d'environ 3 cm dans le collet de la carotte et au milieu d'une des extrémité du tubercule de pomme de terre, en prenant soin de ne pas fendre les légumes. Faire cuire une des carottes et une des pommes de terre dans l'eau bouillante.

4. Couper l'extrémité fermée de grand diamètre d'une cartouche d'encre vide. Par cette ouverture, remplir la cartouche de sirop coloré à l'aide d'une pipette (en fermant l'autre extrémité avec un doigt). Fermer l'ouverture de grand diamètre en y tendant dessus un morceau de cellophane que l'on maintiendra par un bracelet élastique serré autour de la cartouche.
Introduire de quelques millimètres à l'extrémité de petit diamètre de la cartouche un tube d'encre vide de stylo à bille. Sceller à la bougie.
Introduire dans un verre rempli d'eau la partie recouverte de cellophane de la racine artificielle ainsi préparée. Au bout de quelques heures, observer la montée du sirop coloré dans le tube supérieur *(fig. 23.4)*.
Recommencer la même expérience en remplaçant la cellophane par un morceau de film plastique pour protéger les aliments. Constater qu'il n'y a aucune montée de sirop coloré observable.
5. En frappant délicatement le gros bout d'un œuf de poule cru, à l'aide d'une pince fine, casser un morceau de coquille, puis enlever avec soin sans détacher la membrane blanche sous-jacente. Percer l'autre bout (coquille et membrane) d'un trou d'épingle. Plonger le gros bout de l'œuf dans un verre à moitié rempli d'eau, le petit bout restant émergé. Recouvrir le verre d'un film plastique transparent évitant l'évaporation.
Après plusieurs heures, observer les épanchements de liquide albumineux par le trou du petit bout *(fig. 23.5)*.

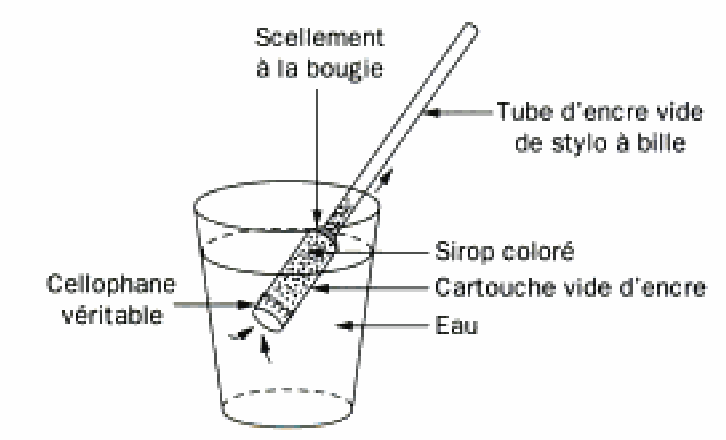


Figure 23.4. Mise en évidence du phénomène d'osmose.

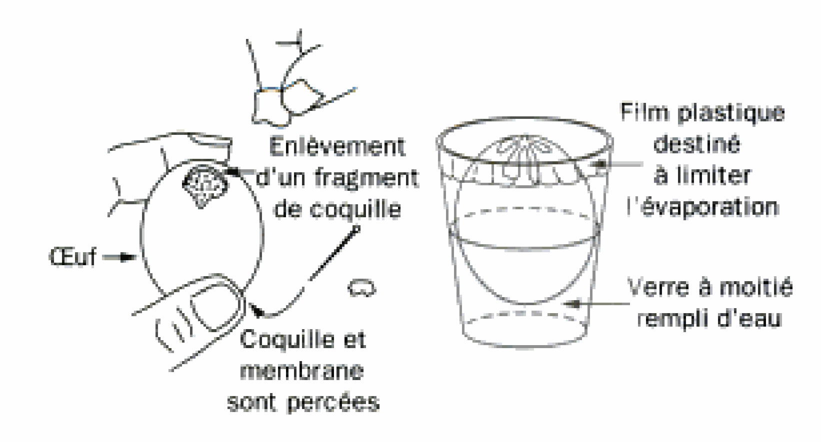


Figure 23.5. Les phénomènes d'osmose dans l'œuf.

Résultats, observations et interprétation

Le passage de l'eau dans les cellules est assuré au travers de membranes cellulaires vivantes ou semi-perméables, comme la cellophane, par l'osmose, force équivalente à une pression s'exerçant du milieu le moins concentré vers le plus concentré, jusqu'à l'équilibre entre les deux concentrations. Les cellules se gonflent d'eau, deviennent turgescentes lorsque le milieu extérieur est moins concentré en substances dissoutes que le milieu intracellulaire et, au contraire, se flétrissent, se plasmolysent dans le cas inverse.



Biologie animale

1. Observation de quelques Protozoaires d'eau douce

Mots clés

Infusion, culture, multiplication, kyste.

Principe

Le monde des animaux unicellulaires, les Protozoaires, est très diversifié et regroupe des formes animales à vie libre ou parasite, voire symbiotique.
L'étude d'une culture de protozoaires d'eau douce permet de se faire une idée de cette variété de formes et de comportements.

Sécurité

Cette manipulation ne présente aucun danger.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

Faire une série de macérations ou d'infusions à base de végétaux (tiges de cresson ou autres plantes aquatiques d'eau douce, etc.) échelonnées sur deux ou trois semaines au minimum de façon à pouvoir suivre aisément les modifications de ce microcosme biologique en fonction du temps.

■ ***Réactifs***

En vue d'une observation vitale

- Une solution de rouge neutre à 1/1 000 ou 1/10 000 (eau distillée 100 mL, poudre de rouge neutre à raison de 0,01 ou 0,001 g) met en évidence les vacuoles digestives ; la teinte de la solution varie d'ailleurs avec le pH : ainsi, pour un pH > 7, celle-ci est rouge sombre tandis que, pour un pH < 7, la teinte est jaune ou orangée ; le rouge neutre peut alors être apprécié comme un indicateur de pH.
- Une solution de bleu de méthylène à 1/1 000 colore les vacuoles pulsatiles et le macronucléus. Cependant, il s'agit d'un colorant vital médiocre, car le bleu de méthylène tue le micro-organisme en quelques minutes.
- Une solution d'encre de Chine très diluée (suspension de particules de carbone) met en évidence l'ingestion alimentaire, la circulation des vacuoles au sein de l'endoplasme et leur évacuation au niveau du cytoprocte.

En vue d'observations fixées et colorées

- Une solution de vert de méthyle acétique (eau distillée 100 mL, acide acétique 1 mL, poudre de vert de méthyle 1 g) tue le protozoaire et colore en vert le ou les noyaux.
- Une solution iodo-iodurée (eau distillée 100 mL, iodure de potassium 10 g, iode 1 g) tue également le protozoaire et colore en jaune le hyaloplasme, les inclusions et le noyau en marron.

■ ***Matériel***

- Grains de blé.
- Cristallisoir.
- Tubes à essai.
- Pipette.
- Aiguille droite.
- Aiguille lancéolée.

Pour les « immobiliser », placer quelques fibres de coton hydrophile sur la lame.
Pour les endormir, utiliser une solution anesthésiante telle que :
- le phosphate monopotassique à 1,4 % ;
- l'alcool méthylique à 10 % ;
- la solution de Corri (3 gouttes de chloroforme, alcool méthylique à 96 %, 90 mL d'eau distillée).

Résultats, observations et interprétation

■ *Observation vitale*

- Prélever directement une goutte de l'infusion sans lamelle pour se rendre compte de la densité des protozoaires, de leur diversité et de leurs mouvements rapides. Recouvrir ensuite d'une lamelle sans appuyer. Observer à l'objectif 4 tant que les mouvements sont trop rapides pour passer à l'objectif 10.
- A la goutte de macération ou d'infusion, on ajoute un soupçon de rouge neutre (à 1/1 000) pour colorer les vacuoles digestives : la coloration doit pénétrer très lentement pour être élective. La surveiller à l'objectif 4 sans lamelle. Lorsque les vacuoles sont bien colorées, déposer une lamelle. Le rouge neutre en faible concentration est un colorant vital, les Unicellulaires ne sont pas tués. Lorsque leurs déplacements sont assez ralentis, observer à l'aide de l'objectif 10 les mouvements des vacuoles digestives.

■ *Observations fixées et colorées*

A une autre goutte, ajouter un peu de vert de méthyle acétique : aussitôt les protozoaires, les ciliés entre autres, sont tués. Attendre en surveillant à l'objectif 4 que les macronucléi soient suffisamment colorés et recouvrir d'une lamelle. A l'objectif 10, il est alors possible d'observer l'appareil nucléaire (macronucléus et micronucléus) des ciliés (voir 24.2).
Pour une meilleure étude des cils vibratiles, ajouter une goutte de réactif iodo-ioduré à une goutte de la culture. Le cytoplasme coagule aussitôt et se colore en jaune-brun. Bien diaphragmer pour observer les cils ; ceux-ci immobilisés s'observent facilement ainsi que la zone du cytoplasme périphérique ou ectoplasme où ils sont implantés.
Si l'on ajoute du bleu de méthylène (à 1/1 000), on colore spécifiquement les vacuoles pulsatiles ; mais ce colorant détermine, en moins de 5 minutes, l'éjection des trichocystes et la mort du cilié.

■ *Analyse de quelques représentants unicellulaires*

- Le Bodo, flagellé saprophage au corps allongé (25 µm), est doté de 2 flagelles peu visibles ; il prolifère surtout dans les macérations riches en matières végétales dont il se nourrit *(fig. 24.1)*.
- Le Colpidium (100 µm), fréquent dans une infusion, est plus petit que la Paramécie. Son corps est ovoïde et son bord antérieur est déjeté sur le côté à la manière d'un bonnet phrygien *(fig. 24.2)*.
- Le Colpode (50 à 60 µm) offre une silhouette qui évoque un haricot dont le hile indiquerait l'emplacement du péristome *(fig. 24.3)*.

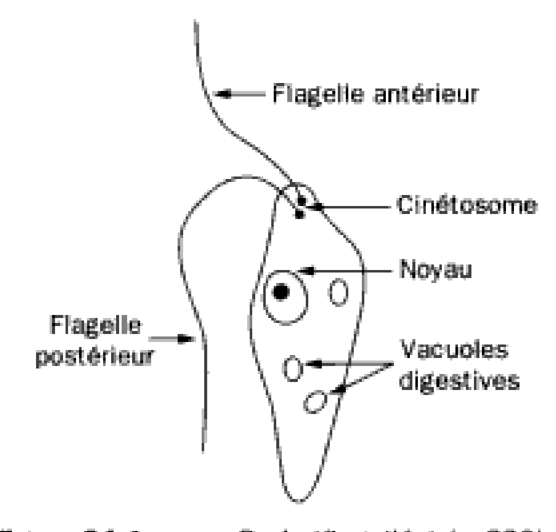


Figure 24.1. g. Bodo (flagellés) (× 600).

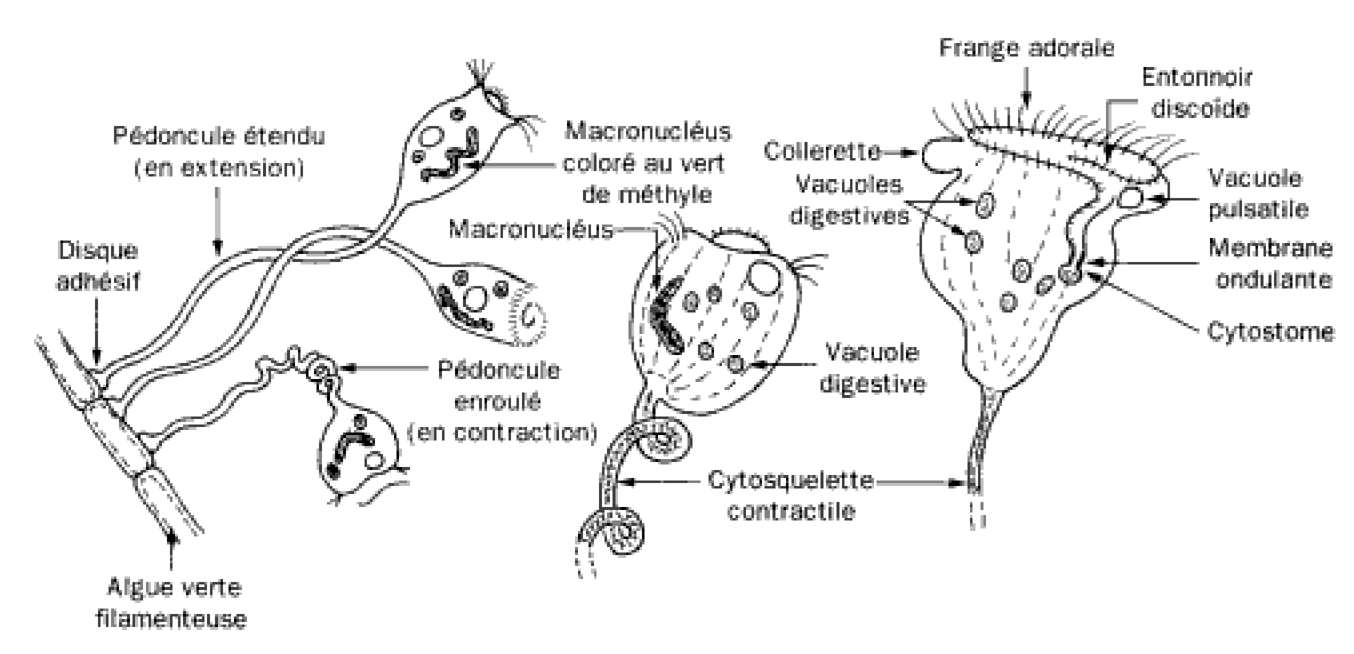


Figure 24.5. Vorticelle (× 350).

■ ***Devenir d'une culture de protozoaires***

Si l'infusion se dessèche entièrement, prélever un échantillon « sec » au fond du récipient de culture et ensemencer une décoction stérile ; celle-ci ne tarde pas à se troubler.

Une analyse microscopique de son contenu révèle la présence de protozoaires ciliés (Colpodes, etc.) nés à la suite du dékystement de leurs formes de résistance et de dissémination, les kystes préalablement formés dans l'ancienne macération anhydre.

Conclusion

Une population de protozoaires évolue au sein d'un milieu de culture comme dans la nature (flaques d'eau, ruisseaux, etc.).

La flore bactérienne, la première apparue, devient bientôt la source de nourriture de protozoaires flagellés et ciliés végétariens, à leur tour consommés par des espèces carnassières.

Figure 24.6. Dileptus.

En fin de culture, avec l'apparition de conditions défavorables (alimentation insuffisante, appauvrissement en oxygène, surpopulation, accumulation de déchets divers, etc.), beaucoup de protozoaires s'enkystent et passent alors en vie ralentie ; ils sont capables d'être ensuite dispersés dans l'air à de grandes distances jusqu'à retrouver un nouveau milieu de vie naturel ou artificiel.

2. La Paramécie : un cilié d'eau douce

Mots clés

Cils vibratiles, vacuole pulsatile, vacuole digestive, osmorégulation, division binaire, conjugaison.

Principe

Observation d'un Protozoaire, organisme dont la cellule unique doit assurer toutes les fonctions de la vie (relation, nutrition et reproduction) (voir 24.1).

Sécurité

Cette manipulation ne présente aucun danger.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***
Voir section 1.

■ ***Réactifs***
– Mélange bleu coton + KOH à 3 % pour visualiser les trichocystes.
– Voir également les réactifs préconisés p. 272.

■ ***Matériel***
– Microscope.
– Lames et lamelles.
– Verres de montre.
– Cristallisoir.

Mode opératoire

■ ***Obtention d'une culture***
Voir 24.1.

■ ***Technique d'observation***
Voir 24.1.

Résultats, observations et interprétation

La Paramécie est un protozoaire de grande taille (jusqu'à 325 µm de longueur).
Rendue observable par chacun des traitements précédents (voir 24.1), la Paramécie possède un cytoplasme distribué en :
– un ectoplasme périphérique, hyalin et visqueux ;
– un endoplasme profond, granuleux et fluide contenant le complexe nucléaire et diverses inclusions (vacuoles digestives, pulsatiles, réserves de glycogène, etc.).

■ ***Ectoplasme et vie de relation***
La cuticule élastique et souple maintient la forme allongée et hydrodynamique de la Paramécie. Cependant, le protozoaire peut se déformer, même se plier en deux, pour changer par exemple de direction lorsque son déplacement est arrêté par un obstacle.
La perméabilité de sa membrane plasmique permet le passage de l'oxygène et de l'eau. Vis-à-vis de l'oxygène, l'animal manifeste un fort chimiotactisme positif qui lui fait rechercher les bulles d'eau égarées dans la préparation microscopique observée *(fig. 24.7)*.

Les cils vibratiles *(fig. 24.7 et 24.8)*, uniformément répartis (la Paramécie est un cilié holotriche) suivant des lignes longitudinales obliques, battent de façon coordonnée le long de chaque ligne d'implantation ou cinétie (en réalité, chaque cil bat avec un léger retard sur le précédent si bien que l'examen montre une série d'ondes parcourant toute la ciliature).

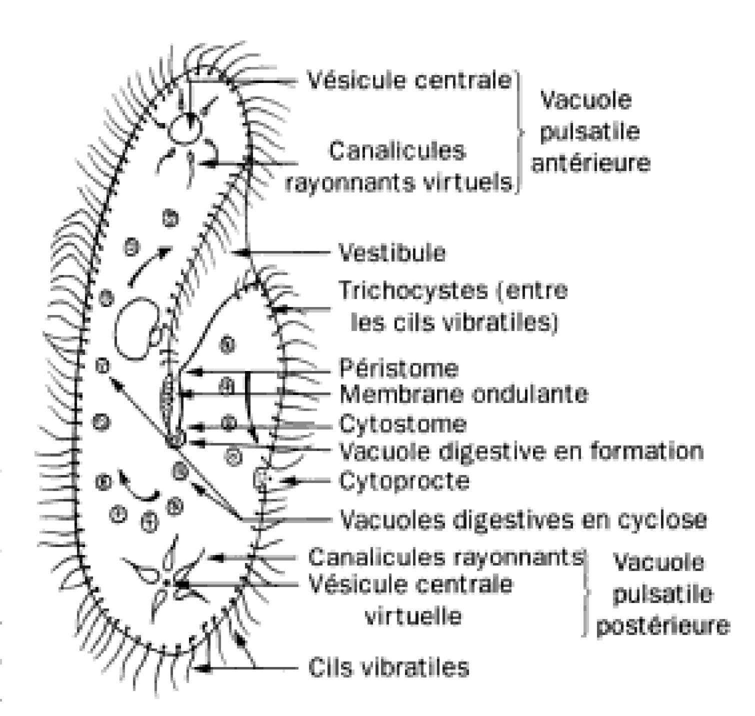


Figure 24.7. *Paramecium caudatum* (× 300) (Protozoaires ciliés holotriches).

Le rythme (plusieurs fois par seconde) augmente à la suite d'une augmentation de température ; au contraire, il diminue sous l'action d'anesthésiques (comme on l'a évoqué précédemment).

Lorsque l'animal est immobilisé, l'activité de la ciliature entraîne le déplacement de l'eau environnante, phénomène rendu plus évident encore en ajoutant une goutte d'encre de Chine fortement diluée.

Dans les conditions naturelles, la ciliature assure la locomotion de l'organisme, la disposition oblique des cinéties entraînant une rotation de l'animal sur lui-même selon un mouvement hélicoïdal : il « se visse » en quelque sorte dans son milieu aquatique.

Sous l'action du réactif iodo-ioduré *(fig. 24.8)*, le Protozoaire est aussitôt tué, prend une coloration jaune-brun et sa ciliature toute hérissée devient évidente. La base de chaque cil vibratile devenue bien visible est de nature centriolaire.

Les trichocystes, situés entre les cils vibratiles, sont de petites vésicules (1 µm de longueur). Si on ajoute, à l'aide d'une pipette, un mélange de bleu coton à 1 % et de potasse à 3 %, il se produit l'éclatement immédiat des trichocystes. Ces derniers contiennent en effet un liquide qui coagule en un filament pointu (jusqu'à 12 µm de long) au contact de l'eau ambiante.

Chez la Paramécie, ce sont des organites de défense qui paralysent un prédateur éventuel ou les petits animalcules qui les frôlent.

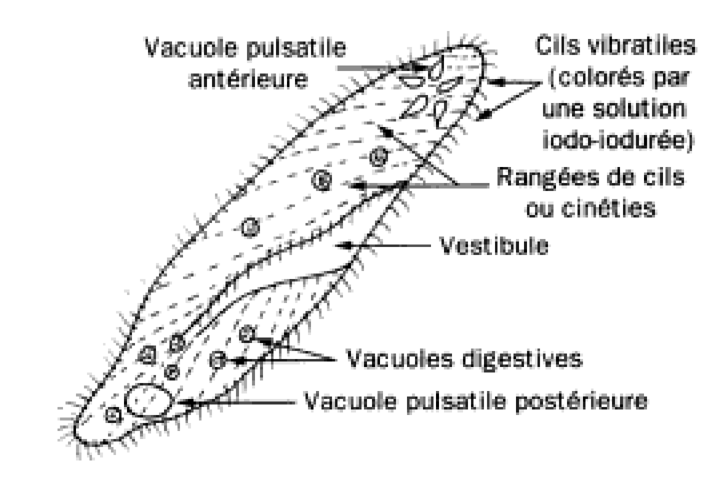


Figure 24.8. La ciliature : cinéties et cils vibratiles (× 250).

■ ***Endoplasme et vie de nutrition***

Lorsque l'animal tourne sur lui-même, sur le bord qualifié de ventral, un sillon oblique ou vestibule s'enfonce et se rétrécit vers l'arrière en un péristome au fond duquel s'ouvre le cytostome.

Grâce à la ciliature spécifique du vestibule et à celle du péristome qui constitue une membrane ondulante, les proies microscopiques (bactéries, etc.) sont entraînées en tourbillonnant vers le cytostome qui, dépourvu de cuticule, voit se former régulièrement, par

Les vacuoles pulsatiles et le vestibule ne se divisent pas. Aussi, chaque vacuole pulsatile se retrouve dans les paramécies-filles dont l'une récupère également le vestibule ; un nouveau vestibule et deux nouvelles vacuoles pulsatiles (une pour chaque cellule-fille) sont néoformés en fin de division.

Cette division binaire rapide explique la prolifération des individus au sein d'une culture.

En conditions défavorables (dans une culture « vieille », appauvrie en oxygène et enrichie en déchets de toutes sortes, etc.), le rythme des divisions diminue et la scissiparité ou reproduction asexuée cède la place à la reproduction sexuée ou conjugaison ; on observe alors des individus accolés par leur face ventrale.

Des études approfondies ont permis de considérer cette conjugaison comme un phénomène sexuel, avec méiose et fécondation caractéristiques, assurant un brassage génétique et un « rajeunissement » des lignées de Paramécies.

Au terme de la conjugaison, la population de ciliés retrouve un comportement « juvénile » avec retour à des divisions binaires fréquentes.

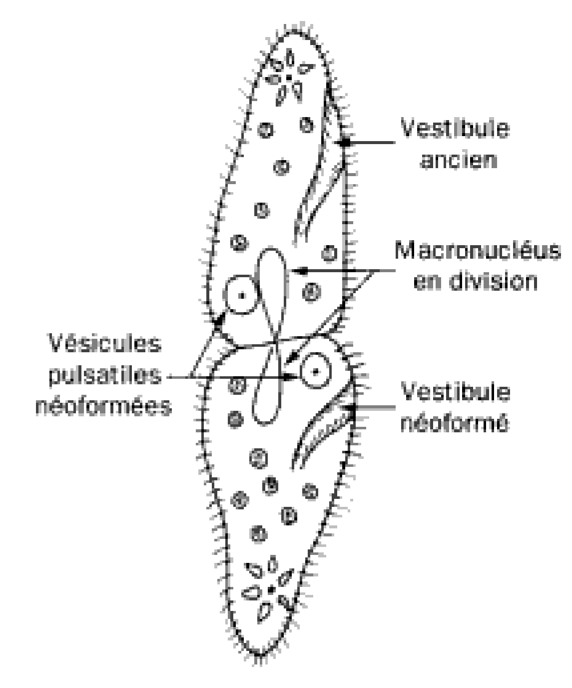


Figure 24.10. Division binaire transversale d'une Paramécie (Ciliés) (× 250).

Conclusion

Au total, la cellule d'un Protozoaire accomplit toutes les fonctions nécessaires à la vie et à la perpétuation des espèces. Ses organites se spécialisent à la manière des organes des animaux pluricellulaires (ou Métazoaires). Il s'opère ainsi une division du travail physiologique si bien qu'un Protozoaire n'est pas directement comparable à une cellule de Métazoaire, mais plutôt à un organisme entier.

1. Les pièces buccales d'un insecte

Mots clés

Labre, mandibules, maxilles, labium.

Principe

Pour la mise en évidence des pièces buccales, rabattre la tête vers l'avant, l'insecte reposant sur le dos. Autour de la cavité pré-orale, on distingue les pièces dans l'ordre suivant : le labium, les maxilles, les mandibules et le labre.

Sécurité

Eviter d'inhaler xylène et chloroforme ou acétate d'éthyle à manipuler avec précaution. Port de masque conseillé.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

Un insecte broyeur : le criquet, la sauterelle, le hanneton, etc.

■ ***Réactifs***

– Eau glycérinée.
– Solution de chloral-phénol.
– Xylène.
– Baume du Canada.
– Chloroforme ou acétate d'éthyle.
– Alcool à 70 %.

■ ***Matériel***

– Loupe à main.
– Loupe binoculaire.
– Microscope.
– Aiguille emmanchée.
– Pince spéciale pour insectes à pointes fines.
– Papier Bristol.

Mode opératoire

Pour tuer les insectes sans les altérer, les disposer quelques minutes dans un bocal contenant un tampon de coton hydrophile imbibé de chloroforme ou d'acétate d'éthyle.
Remarque : on peut ensuite les conserver dans l'alcool à 70 %, à renouveler périodiquement.
Ainsi, les pièces buccales peuvent être étudiées sur des individus fraîchement tués ou bien conservées dans l'alcool à 70 %.
Une fois la tête séparée du reste du corps, l'immobiliser sous la loupe binoculaire à l'aide d'une aiguille emmanchée et avec une pince à pointes fines. Désarticuler et arracher les pièces buccales avec précaution si l'on désire les récupérer entières.
On procède d'arrière en avant et on recueille dans cet ordre : le labium, puis les maxilles et l'hypopharynx, les mandibules et le labre.
Les placer entre lame et lamelle dans une goutte d'eau glycérinée pour éviter la dessiccation trop rapide.

■ ***Variante***

Ces pièces sont disposées ensuite dans leur position « naturelle » sur un petit rectangle de papier blanc pour être directement examinées à la loupe binoculaire. Pour les conserver quelques heures, les coller sur du papier Bristol.

Si on souhaite réaliser une préparation durable, il convient de faire séjourner, pendant quelques jours, les pièces buccales dans du chloral-phénol de Amann dans le but de les éclaircir, de les déshydrater et de les ramollir.
Après un lavage au xylène, monter dans du baume du Canada.

Résultats, observations et interprétation

En position latéroventrale, les pièces buccales d'un Insecte, ici un insecte broyeur, se répartissent d'avant en arrière de la tête dans la disposition suivante *(fig. 25.1)*.

- Le *labre* (ou lèvre supérieure) n'est pas un véritable appendice contrairement aux autres pièces, mais un repli cuticulaire ou sclérite chitineux en forme de pelle, mobile autour d'un axe transversal le rendant solidaire du clypeus sus-jacent *(fig. 25.1A)*.
- Les *mandibules* (ou Md) en arrière du labre, de part et d'autre de l'orifice buccal, sont les pièces buccales les plus spectaculaires d'un insecte broyeur. Ce sont des organes robustes, formés d'un seul article (ayant valeur de coxopodite), sclérotinisés, articulés avec la tête au moyen de deux condyles et animés par deux séries de muscles : les extenseurs plus grêles que les fléchisseurs plus puissants *(fig. 25.1B)*.
  Chaque mandibule présente une extrémité masticatrice fonctionnelle avec un bord lisse externe et un bord interne complexe où l'on distingue :
  - vers l'extérieur, une région incisive étroite et coupante formée de trois ou quatre pointes à section losangique, chargée de sectionner les végétaux ;
  - vers la base, une région molaire large et broyeuse agrémentée de trois ou quatre tubercules arrondis, assurant le broyage de ces végétaux.

  Les deux mandibules ne sont pas identiques mais complémentaires. A chaque relief de l'une correspond un creux chez l'autre.
- Les *maxilles* (encore appelées mâchoires et codées Mx) sont typiquement des appendices biramés voisins de ceux des Crustacés ; ils comportent un protopodite, un télopodite à deux rames (exopodite et endopodite) et un endite *(fig. 25.1C)*.
  Plus précisément, on y retrouve :
  - le protopodite (ou base de l'appendice) avec deux articles : le cardo de forme triangulaire portant un condyle d'articulation et un apodème squelettique et le stipès d'aspect rectangulaire ;
  - l'exopodite (ou rame externe) avec un palpe maxillaire formé de cinq articles : les deux premiers sont courts et les trois autres longs (les 4e et 5e largement dilatés) ; chaque palpe s'articule sur un relief précis du stipès, le palpigère. Le palpe maxillaire est un organe complexe à fonction sensorielle tactile avant tout ; mais son article distal (ou terminal) contient, à son extrémité, des terminaisons nerveuses dendritiques estimées gustatives ;
  - l'endopodite (ou rame interne) avec deux articles, la sous-galéa et la galéa ; celle-ci plus volumineuse forme une gouttière « en casque » protégeant le bord externe de la lacinia ;
  - l'endite, sclérotinisée, est la lacinia dont les trois pointes acérées indiquent le rôle masticateur.
- L'*hypopharynx* (ou langue) est une pièce impaire, dérivée du plancher buccal et localisée en arrière des lacinias ; de forme cylindrique, il s'agit d'un organe charnu contenu dans la cavité buccale entre labre, labium et mandibules.
- Le *labium* (ou lèvre inférieure), pièce masticatrice impaire, résulte de la fusion de deux appendices biramés ayant la même organisation que les maxilles précédentes. En ce sens, le labium est considéré comme homologue de la deuxième paire de mâchoires des crustacés *(fig. 25.1D)*.
  - les protopodites soudés sont formés de trois articles aplatis transversalement : le submentum et le mentum (équivalents des cardos) ainsi que le prémentum (homologue des stipès) ;

Conclusion

Les pièces buccales destinées à la mastication d'organes végétaux solides (racines, tiges feuillées, bourgeons, etc.) forment un appareil buccal broyeur (criquet, blatte, etc.), considéré comme primitif, car existant déjà chez les premiers insectes apparus sur la terre, à l'ère primaire, au même titre que chez beaucoup de larves d'insectes actuels.

Avec la diversification évolutive des régimes alimentaires, apparue à l'ère secondaire, les composants de l'armature buccale des insectes subissent des modifications. Ainsi, avec des régimes alimentaires à base d'aliments liquides (le nectar des fleurs, les sèves végétales, le sang des animaux, etc.), les pièces buccales précédentes se sont-elles modifiées (par atrophie ou hypertrophie) en vue de constituer des appareils buccaux spécialisés, appareils suceurs chez les Lépidoptères (les papillons), appareils lécheurs-suceurs chez les Hyménoptères (abeille, etc.), appareils piqueurs-suceurs chez les Diptères (moustiques, etc.), etc.

2. Un élevage de criquets

Mots clés

Tête, thorax, abdomen, jeune, métamorphose, imago.

Principe

Etudier l'organisation, la vie et le comportement d'un insecte orthoptère végétarien.

Sécurité

Cette manipulation ne présente aucun danger important. Cependant, certaines personnes peuvent développer des symptômes allergiques sérieux aux sécrétions d'Acridiens. Le port de gants, de masque et de lunettes est donc conseillé.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

Il est aisé de se procurer des criquets vivants auprès d'un laboratoire d'entomologie. Le criquet du genre *Locusta migratoria* est robuste et son élevage n'offre que peu de difficultés, ce qui en fait un matériel très favorable en vue de l'étude d'un insecte.

Il n'est pas exclu de capturer et d'utiliser d'autres criquets qui pullulent à l'époque des foins dans les prairies.

■ ***Matériel***

Au laboratoire, pour un élevage ne dépassant pas une quinzaine d'individus, utiliser une cage en bois *(fig. 25.2)*, en contre-plaqué par exemple, de dimensions moyennes (50 cm de longueur, 30 cm de largeur et 40 cm de hauteur), que l'on peut fabriquer à peu de frais, en respectant quelques principes de base :

– couvercle amovible, grillagé de préférence, etc. ;
– aérations latérales, etc. ;
– plancher-tiroir amovible facilitant le nettoyage de la cage, etc. ;
– éventuellement, un espace sous le plancher pour le ou les pondoirs.

Prévoir du papier essuie-tout, une douille électrique munie d'une ampoule à incandescence de 40 watts (ou un tube fluorescent), un programmateur électrique hebdomadaire, un ou plusieurs bocaux de 10 cm environ de hauteur à grande ouverture à remplir de sable fin et bien lavé jusqu'au ras du bord supérieur faisant office de pondoirs, des petites branchettes d'arbres ou d'arbustes (chêne, hêtre, noisetier, etc.), une ou deux coupelles, du sable pour les pondoirs (stérilisé à la suite d'un passage à l'autoclave à 120 °C pendant une demi-heure).

Cultiver en parallèle du « blé germé » pour alimenter quotidiennement l'élevage de criquets.

Mode opératoire

■ ***Local d'ambiance***

Disposer dans le fond du vivarium propre des feuilles de papier essuie-tout. Mettre en diagonale au travers de la cage deux ou trois petites branches : avec le grillage du couvercle, elles servent de support aux individus qui veulent muer. Elles permettent également aux insectes de se rapprocher de l'ampoule à leur gré en fonction de la chaleur qu'ils souhaitent recevoir. En effet, la température optimale est de 33 °C avec un minimum de 30 °C. A des températures plus basses, par exemple 25-28 °C, et *a fortiori* inférieures à 25 °C, la mortalité augmente anormalement et l'élevage faiblit. On observe des

La nourriture doit rester fraîche le plus longtemps possible, donc arroser copieusement les terrines de blé et les touffes de paturin. Tremper dans l'eau le bambou et le roseau avant de le donner en quantité proportionnée à celle qui sera réellement consommée.
Par exemple, tous les jours, mettre une « poignée » de blé germé (« gazon vert ») le matin car les habitants de la cage sont diurnes. De temps en temps, ajouter un quartier de pomme, en particulier en fin de semaine lorsque les soins sont plus aléatoires.
Une coupelle contenant un mélange complémentaire (70 % de son, 20 % de lait en poudre, 10 % de pollen) est vivement conseillée pour entretenir un élevage sain de longue durée.
Par ailleurs, les jeunes et les adultes ont besoin d'eau. Disposer une seconde coupelle (ou plus) contenant du coton hydrophile humide qui fournit ainsi l'eau de boisson (dans un petit récipient rempli d'eau, les très jeunes individus risquent de se noyer).

■ ***Ponte***

Dès l'observation des premiers accouplements, introduire dans la cage un ou plusieurs bocaux remplis de sable destinés à être des récipients de ponte ; les remplir de sable stérilisé de rivière (ne pas utiliser du « sable à lapin » trop fin). Maintenir ce sable humide, sans que l'eau coule toutefois.

■ ***Variante***

Dans la nature, les criquets pondent dans le sol. Les insectes en captivité doivent pouvoir le faire. Aussi, lors de la construction de la cage, peut-on prévoir que les pondoirs affleurent au niveau du plancher en étant placés sous ce dernier dans un compartiment aménagé en conséquence : des pots à confiture de 10 cm de profondeur sont valables. Prévoir une ampoule de 25 watts près du pondoir sous le plancher pour obtenir un sable tiède (25-28 °C) qui stimule la ponte.
Les pontes (ou oothèques) sont relevées tous les jours et mises en incubation (à l'intérieur d'une étuve à 33 °C) dans un ou plusieurs récipients plus petits, remplis du même sable humide, mais de 10 à 12 cm de profondeur de manière à laisser un espace libre de 2 à 3 cm à leur partie supérieure ; les couvrir alors d'une plaque de verre ou d'un couvercle non étanche pour ménager une aération convenable.
Mettre une étiquette de date. Humidifier régulièrement et surtout ne jamais laisser sécher, sinon les œufs se dessèchent et meurent.
Le sable des pondoirs peut être réutilisé durant toute la phase de ponte et ensuite jeté.
L'éclosion survient à 33 °C, treize à quinze jours au plus tard après la ponte. A ce moment, les récipients contenant les pontes sont inclinés dans la cage pour « décompacter » le sable et faciliter la sortie des jeunes individus.

Résultats, observations et interprétation

■ ***Présentation***

Elle met en évidence des caractères extérieurs distinctifs des Arthropodes. L'existence d'un revêtement continu, épais et plus ou moins rigide (et inextensible) sur toute la surface du corps constitue le caractère essentiel des Arthropodes. En conséquence, les métamères et les appendices sont articulés, les éléments musculaires se groupent en muscles individualisés.
Le développement post-embryonnaire est entrecoupé périodiquement par le phénomène de mue et se termine avec une dernière mue ou mue « imaginale ».
De même, il est commode de reconnaître distinctement les caractères de la classe des Insectes et de l'ordre des Orthoptères :
– le corps est divisé en trois parties (ou tagmes) : la tête, le thorax et l'abdomen *(fig. 25.3)* ;

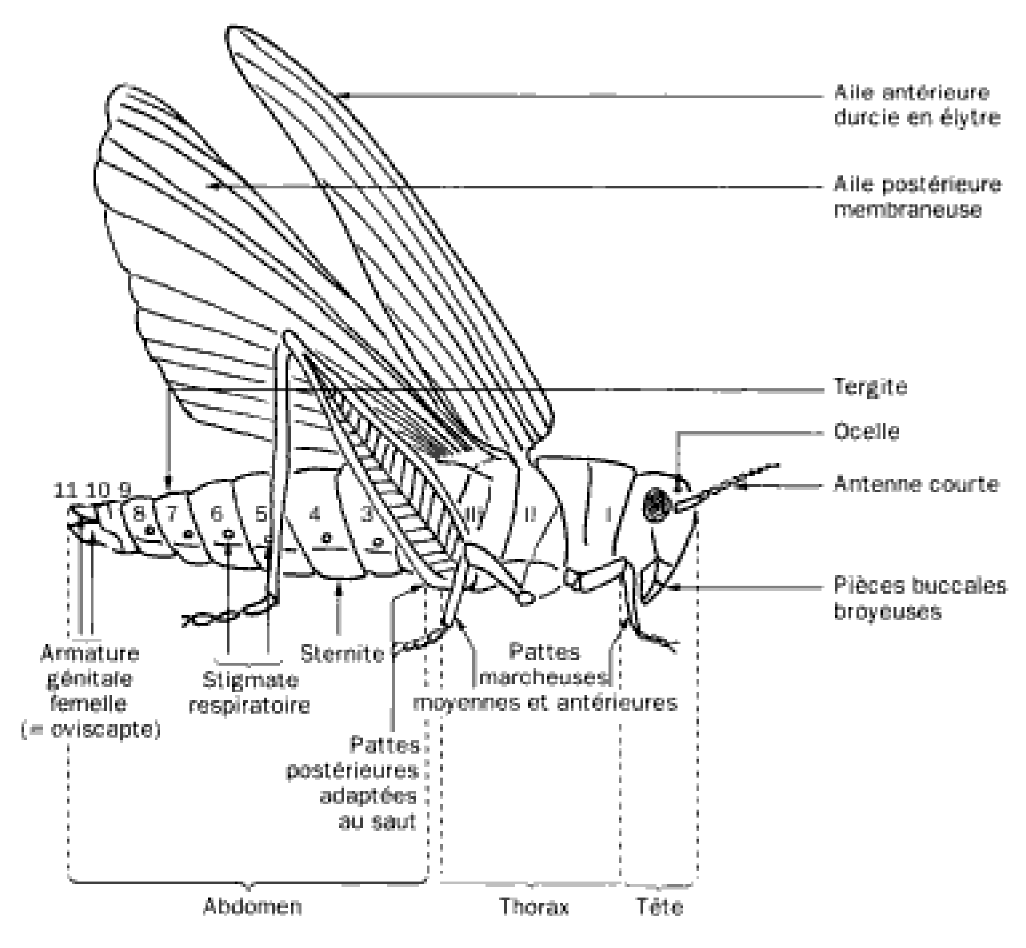


Figure 25.3. Morphologie externe du criquet.

– la tête, toujours d'une « seule pièce », porte les yeux et la bouche entourée elle-même de pièces buccales, ici broyeuses (voir 25.1) ;
– le thorax est divisé en trois métamères : le prothorax (I), le mésothorax (II) et le métathorax (III) ;
– chaque métamère thoracique porte ventralement une paire de pattes (les insectes sont des hexapodes) ;
– le mésothorax porte une paire d'ailes rigides ou élytres ; le métathorax, une paire d'ailes souples et membraneuses (ailes du vol) ; le criquet fait partie des Insectes ptérygotes ;
– l'abdomen ne porte pas d'appendice : on observe à son extrémité postérieure l'anus et l'orifice génital entouré d'une armature génitale (exprimant souvent le dimorphisme sexuel de l'insecte).

■ ***Comportement***

Les manipulations quotidiennes de l'élevage permettent d'observer le comportement des criquets, en particulier les fonctions biologiques liées à leur environnement telles la locomotion, la respiration, l'alimentation, la reproduction, etc.

Les adultes vivent trois ou quatre semaines. Pendant les quinze premiers jours, ils se nourrissent activement avant tout accouplement. Ceux-ci se font alors très nombreux et chaque individu s'accouple plusieurs fois changeant fréquemment de partenaire. La ponte commence durant la troisième semaine et se poursuit plus de dix jours.

■ ***Locomotion***

Les deux premières paires de pattes, pro et mésothoraciques, servent pour les déplacements lents (la marche) ; elles permettent aussi à l'insecte de s'accrocher à un support : le dernier article du tarse porte une paire de griffes recourbées. Mais, grâce à ses pattes postérieures métathoraciques longues et puissantes, l'animal est adapté au saut.

Les battements rapides de la paire d'ailes postérieures membraneuses permettent le vol. Les ailes antérieures ou élytres protègent les ailes membraneuses au repos ; restant étendues et immobiles durant le vol, elles interviennent dans la stabilité et l'orientation du vol. Les ailes antérieures durcies en élytres et les ailes postérieures membraneuses, pliées en éventail au repos, définissent le criquet comme un insecte orthoptère.

■ ***Respiration***

Les criquets comme les insectes en général ont une respiration trachéenne. Les trachées se ramifient dans tout le corps et conduisent l'air directement aux cellules.

En surface, sur l'abdomen notamment, les trachées s'ouvrent sur les côtés des premiers métamères abdominaux par des stigmates bien visibles. Ceux-ci sont pourvus d'un mécanisme d'ouverture et de fermeture chargé de réguler les échanges gazeux respiratoires.

La ventilation trachéenne est assurée par les mouvements de contraction et de dilatation des métamères abdominaux, mouvements déterminés par les muscles respiratoires internes.

■ ***Alimentation***

Le criquet se nourrit essentiellement de végétaux qu'il consomme rapidement grâce à ses pièces buccales broyeuses (voir 25.1). Parfois, il peut dévorer des criquets morts ou d'autres insectes.

■ ***Reproduction***

Celle-ci débute par un accouplement suivi d'une fécondation interne.

La femelle creuse ensuite le sable à l'aide de son abdomen qu'elle enfonce verticalement dans le sol : ce forage lui demande une trentaine de minutes *(fig. 25.4)*.

Ensuite, les valves de l'oviscapte se mettent en mouvement et assurent la sortie des œufs hors de l'abdomen.

Ces événements sont visibles pour les femelles qui pondent fortuitement sur les montants ou le grillage de la cage.

Les œufs sont ovoïdes, de 2,5 mm de long, disposés les uns à côté des autres dans un mucus qui, en se desséchant, agglutine les grains de sable et forme l'enveloppe de la ponte ou oothèque.

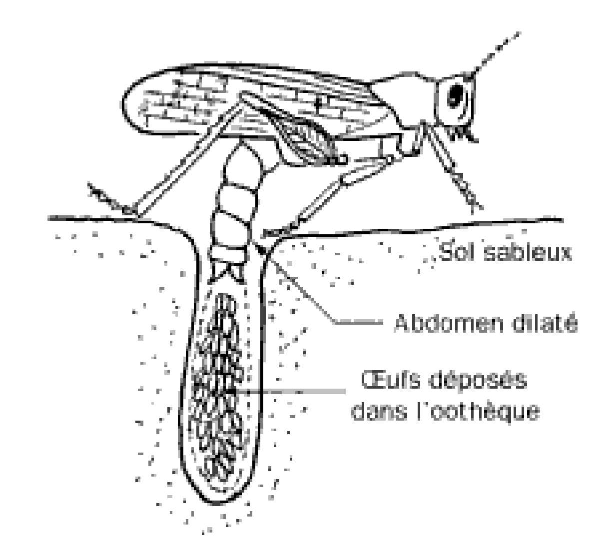


Figure 25.4. Criquet femelle en train de pondre à l'intérieur d'un nid creusé dans la terre meuble.

Cette « coque » est obturée par un petit couvercle de mucus et de sable séchés.

Une femelle pond ainsi plusieurs oothèques (4 ou 5) en un mois.

Chaque oothèque contient 40 à 45 œufs environ et est achevée en 15 minutes. Ce nombre est assez constant quel que soit l'aspect extérieur de l'oothèque, en particulier sa longueur.

L'incubation dure en principe 14 jours (dans une étuve à 33 °C). Un individu de très petite taille, sans ailes, sort de l'œuf, évoquant déjà l'adulte par la forme de son corps et la présence de trois paires de pattes ; sa tête est relativement volumineuse.

D'emblée, le très jeune criquet mène une vie active. Il se nourrit de blé germé, etc., comme les adultes, et atteint bientôt 1 cm de longueur.

La cuticule inextensible est renouvelée à la faveur d'une première mue au cours de laquelle l'ancienne cuticule devenue exuvie se déchire et voit sortir l'individu déjà recouvert de sa nouvelle cuticule encore molle : l'animal se gonfle d'air, déplisse son nouveau tégument et entame son deuxième stade larvaire. Le thorax grandit davantage que la tête qui perd de son importance.

Quatre mues « larvaires » se succèdent ainsi en quelques semaines (4 semaines environ).

Au troisième stade larvaire, apparaissent les ébauches des deux paires d'ailes qui se développent progressivement au cours des stades larvaires suivants *(fig. 25.5)*.

Le cinquième et dernier stade s'achève par la mue « imaginale » d'où sort l'adulte (ou imago) apte, à son tour, à la reproduction.

A l'occasion de cette mue « imaginale », l'insecte se fixe sur une branche par l'extrémité de son abdomen, la tête en bas. L'avant du corps (tête et thorax) se gonfle alors d'hémolymphe entraînant une distension du tégument, au niveau d'une ligne d'exuviation (où la cuticule est plus mince par suite de l'absence d'exocuticule) au milieu du dos. Ce dernier se déchire et entraîne progressivement la sortie de la tête, du thorax et de l'abdomen. Les pattes postérieures caractéristiques des insectes sauteurs sont les dernières à se dégager de l'exuvie, abandonnée ensuite *(fig. 25.6)*.

L'imago dorénavant libre se redresse ; la nouvelle cuticule se rigidifie au contact de l'air ambiant (ayant valeur d'exosquelette), les muscles entrent en action. Une injection d'hémolymphe

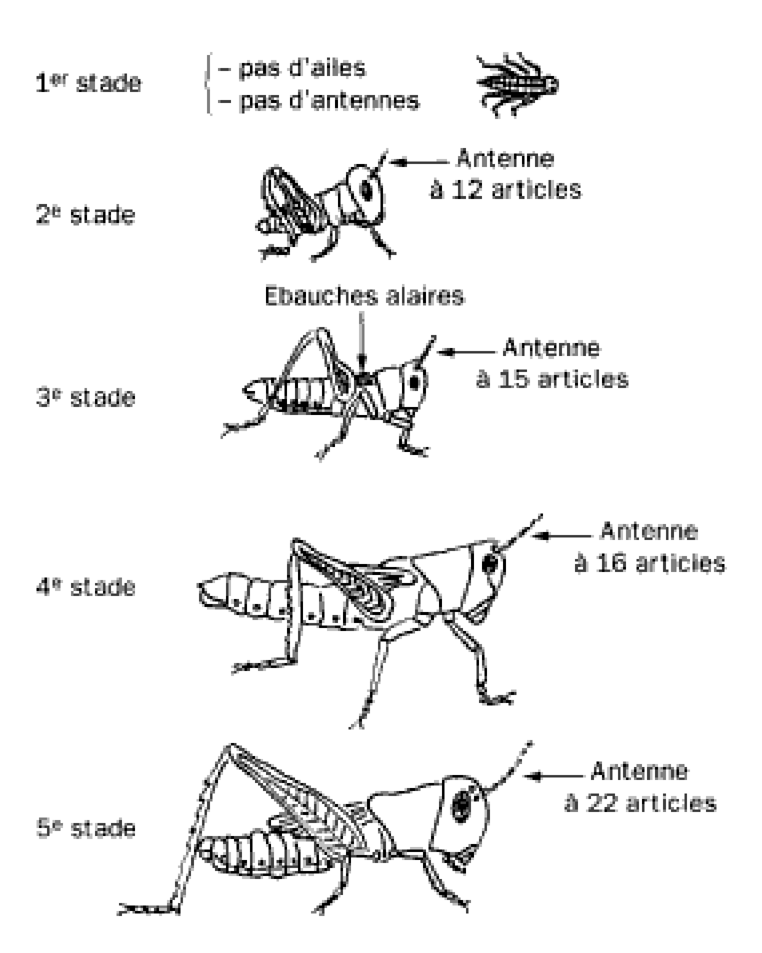


Figure 25.5. Le développement post-embryonnaire du criquet (cinq stades larvaires).

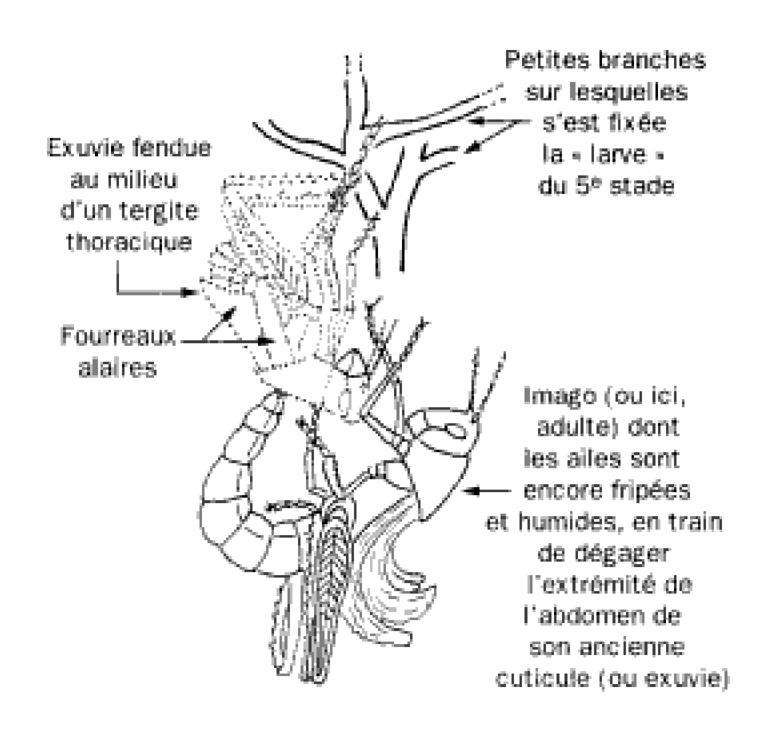


Figure 25.6 La mue « imaginale » du criquet (Insecte orthoptère).

dans les lacunes sanguines des nervures des ailes voit celles-ci s'étaler, puis s'agiter pour achever de se sécher. L'imago est alors capable de voler.
Le criquet ne mue plus et par conséquent a achevé sa croissance.
Au total, le jeune criquet et son imago ayant pratiquement le même mode de vie, le développement post-embryonnaire est progressif et se traduit par l'augmentation de la taille, la mise en place fonctionnelle des organes génitaux et l'installation des ailes.
Ces caractéristiques font ranger le criquet parmi les Insectes hétérométaboles paurométaboles, à métamorphose progressive et « incomplète ».

Conclusion

La conduite de l'élevage permet une observation des criquets, jeunes et adultes, mâles et femelles, ainsi qu'une analyse de leur comportement : locomotion, alimentation, reproduction (accouplement et ponte).
Il convient d'accorder une attention particulière aux individus en période de mue.
A ce propos, compter les mues, noter le jour où elles se déroulent. Chaque fois, prendre la mesure de la taille et de la masse de l'animal en vue de construire les courbes de croissance linéaire et pondérale (en abscisses, exprimer le temps en jours et en ordonnées, les tailles en millimètres, etc.).
Vérifier ainsi la croissance discontinue « en marches d'escalier » caractéristique des Insectes et des Arthropodes en général, par suite de l'existence de la cuticule inextensible.



Mise en évidence d'une chimiotaxie lors de la fécondation *in vitro* de l'œuf d'oursin

Mots clés

Fécondation, oursins, gamètes, gamones, chimiotaxie, physiologie.

Principe

A l'aide d'oursins observer la migration des spermatozoïdes vers les ovocytes puis la fécondation de ceux-ci et les premiers stades de division de l'œuf.

Sécurité

Cette expérience ne présente aucun risque lié directement à la manipulation. Port de gants conseillé.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

Oursins comestibles *(Paracentrotus lividus)*, achetés très frais (les piquants et les ambulacres doivent être encore mobiles) chez le poissonnier ou, mieux, pêchés en plongée en apnée (si l'expérimentateur a la chance d'être à proximité de fonds rocheux de la Manche, de l'Atlantique ou de la Méditerranée) en automne et au printemps et à entreposer au réfrigérateur pendant les quelques heures séparant l'achat de l'expérience.

■ ***Réactifs***

– Mélange de sels pour aquarium marin (obtenu chez les marchands d'aquarium).
– Solution de bleu de méthylène à 10 g/L.

■ ***Matériel***

– Ciseaux de poissonnier ou scie à métaux.
– Deux paires de pinces fines.
– Deux aiguilles lancéolées.
– Boîtes de Pétri.
– Trois pipettes.
– Quatre lames et quatre lamelles de microscope.
– Une lame à concavité pour microscope.
– Un microscope grossissant au moins 500 fois.
– Papier filtre fin.
– Petits cristallisoirs (ou cuvette ou saladier).
– Petit entonnoir.

Mode opératoire

Préparer plusieurs litres d'eau de mer artificielle en dissolvant le mélange de sel dans de l'eau stérilisée à raison de 35 g/L.
Si les oursins ne rejettent pas spontanément leurs gamètes par les pores génitaux situés au pôle supérieur (liquide blanchâtre chez les mâles ou orangé chez les femelles), on pourra tenter d'en provoquer l'émission par un choc thermique en plongeant chaque oursin sortant dans un récipient contenant de l'eau tiède à 30 °C, ou bien, ce qui sera le plus pratique dans la majorité des cas, ouvrir les oursins en les découpant selon leur équateur *(fig. 26.1A)*.
Les testicules apparaissent jaune ou rose pâle et les ovaires granuleux et orange vif.

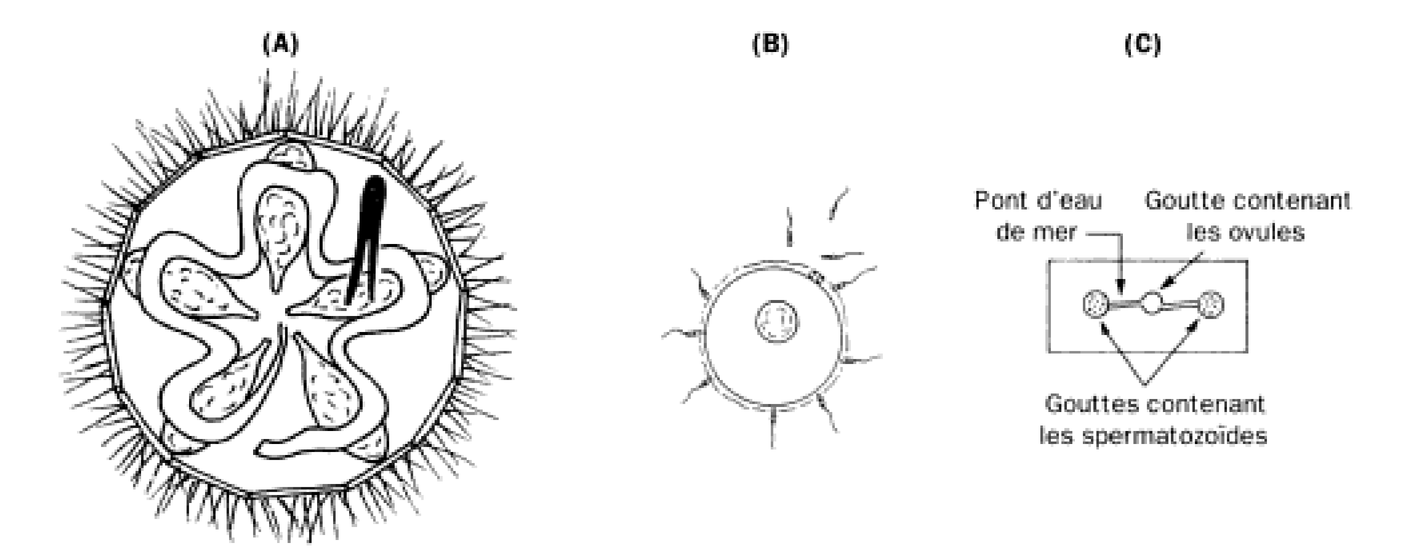


Figure 26.1. Mise en évidence de la chimiotaxie lors de la fécondation *in vitro* de l'œuf d'oursin.
(A) Prélèvement de la laitance.
(B) Spermatozoïdes assemblés autour d'un ovule.
(C) Migration des spermatozoïdes.

1. Recueillir à l'aide d'une pipette (une pour chaque sexe) la laitance mâle et femelle séparément dans des boîtes de Pétri, ou bien prélever un fragment de gonade à l'aide d'une pince fine (différente pour chaque sexe) et le dilacérer à l'aide de l'aiguille lancéolée (différente pour chaque sexe), dans le fond de petits cristallisoirs remplis d'eau de mer sur 1 cm de hauteur.
Placer une pipette étiquetée mâle et une pipette étiquetée femelle dans les cristallisoirs correspondants.

2. Prélever une goutte de chaque liquide et examiner au microscope au fort grossissement entre lame et lamelle (sans appuyer sur la lamelle).
Si la gonade mâle est mûre, les spermatozoïdes deviennent rapidement mobiles. Si la gonade femelle est mûre, les noyaux des ovules sont petits et à contour mal délimité.

3. Observer les spermatozoïdes d'abord vivants dans l'eau de mer, puis fixés avec une goutte de bleu de méthylène ajoutée. Evaluer, avec un oculaire micrométrique ou à l'aide d'une bande de papier millimétré transparent placé sous la lame, la longueur des spermatozoïdes et le diamètre des ovules.

4. Placer, avec la pipette étiquetée femelle, une goutte d'eau de mer contenant les ovules mûrs sur une lame à concavité et ajouter avec l'autre pipette une petite goutte d'eau de mer contenant les spermatozoïdes (en prenant soin de ne pas mettre l'extrémité de la pipette en contact avec le liquide contenant les ovules). Recouvrir d'une lamelle et observer à l'objectif fort du microscope. Les spermatozoïdes s'assemblent autour des ovules. Au bout d'un quart d'heure observer le déroulement des fécondations *(fig. 26.1B)*.

5. Recommencer l'expérience en plaçant une goutte de chaque liquide à 1 cm l'une de l'autre sur une lame ordinaire. Réunir celles-ci en déposant délicatement une goutte d'eau de mer pure à l'aide d'une pipette propre. Observer au microscope la migration des spermatozoïdes vers la goutte contenant les ovules. Chronométrer le temps mis par les spermatozoïdes pour atteindre les ovules. Calculer leur vitesse moyenne de nage en m/s *(fig. 26.1C)*.

6. Placer une goutte contenant les ovules sur une lame propre. A l'aide de l'aiguille lancéolée qui avait servi à dilacérer les gonades femelles, éliminer les ovules de la goutte. Ajouter sur la lame, à 1 cm de cette goutte, une goutte contenant les spermatozoïdes puis établir un pont d'eau de mer pure entre les deux gouttes. Constater que les spermatozoïdes migrent vers la goutte qui a contenu les ovules.
Filtrer sur un papier filtre fin de l'eau de mer contenant les ovules. Déposer sur une lame propre une goutte d'eau de mer filtrée. Renouveler l'expérience précédente. Constater que les spermatozoïdes migrent encore vers la goutte dans laquelle avaient séjourné des ovules.

7. Placer une goutte d'eau de mer pure sur une lame propre puis à 1 cm une goutte contenant des spermatozoïdes. Réaliser un pont d'eau de mer pure entre les gouttes. Constater que les spermatozoïdes n'ont plus de mouvements d'ensemble orientés vers l'autre goutte.

8. Mélanger dans un récipient propre, à fond plat et large, le contenu des deux cristallisoirs. Couvrir le récipient d'une plaque pour éviter l'évaporation.
Laisser reposer au moins 3 heures. Prélever toutes les demi-heures à l'aide d'une pipette propre quelques gouttes de ce mélange. Observer au microscope les premiers stades embryonnaires de segmentation des œufs.

Résultats, observations et interprétation

Les expériences 5, 6 et 7 montrent que les ovules libèrent dans le milieu ambiant une substance, ou gamone, capable d'attirer par chimiotaxie les spermatozoïdes qui s'agglutinent à la gangue qui entoure l'ovule. Au contact, la tête du spermatozoïde fécondant l'ovule édifie un cône. La tête du spermatozoïde pénètre dans l'ovule, tandis que le flagelle est abandonné à l'extérieur.
L'ovule exsude un liquide qui soulève la membrane. La tête prend la forme d'une vésicule et le noyau s'entoure d'un aster (pronucléus mâle). Celui-ci se rapproche du noyau de l'ovule, puis fusionne avec celui-ci. L'ovule fécondé devient un œuf qui, peu de temps après, se divise en deux cellules embryonnaires. Plus tard, le jeune embryon subit plusieurs divisions ou segmentations avant de devenir une larve nageuse.
En fécondant l'ovule, le spermatozoïde provoque donc un changement d'état physiologique de l'ovule et déclenche la division cellulaire amorçant le développement embryonnaire.



Les Mollusques

Sommaire

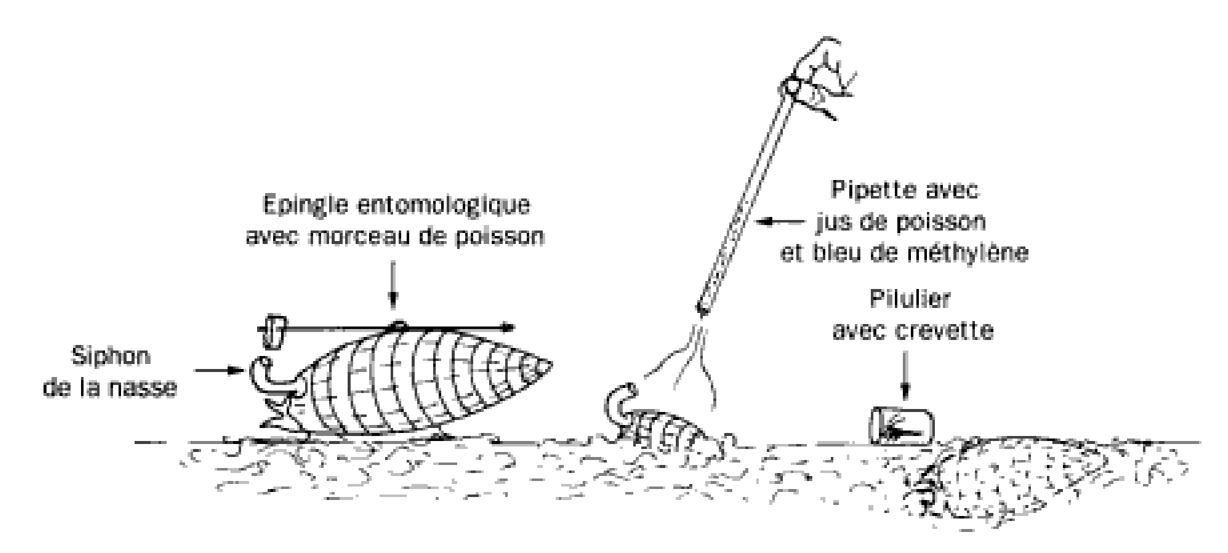
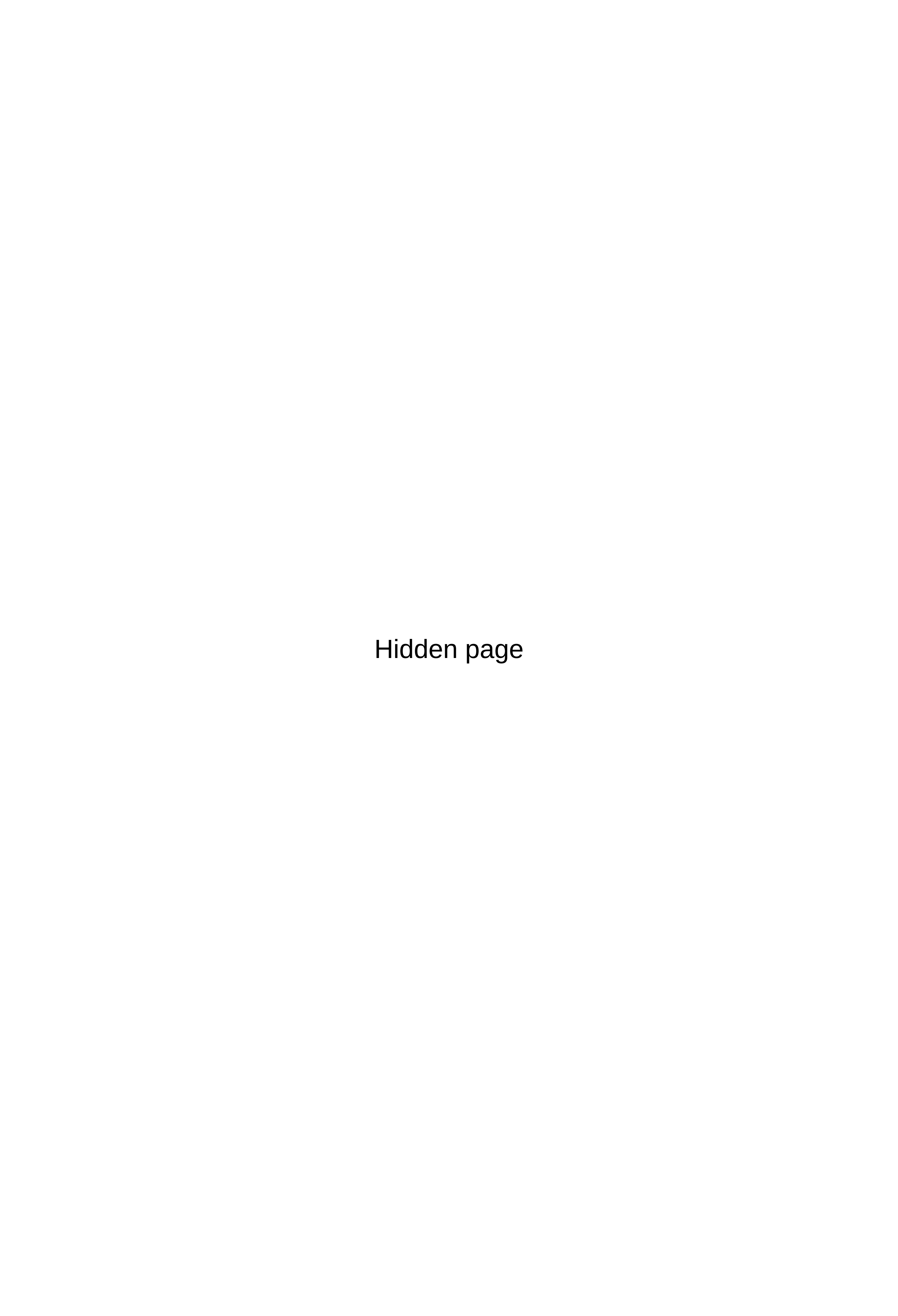


Figure 27.1. Comportement nécrophage de la nasse.

Taper sur la surface du sable sans mettre les doigts dans l'eau, à l'aide d'un objet quelconque par exemple une baguette de bois. Constater que les nasses demeurent enfouies. Disposer un pilulier fermé, contenant un morceau de poisson mort ou une crevette décongelée. Constater que les nasses demeurent enfouies.
Introduire une crevette vivante. Les nasses demeurent enfouies.
Broyer un morceau de poisson ou des crevettes décongelées dans quelques cm^3 d'eau de mer artificielle. Filtrer sur papier filtre, recueillir le jus dans un pilulier et ajouter deux gouttes de solution de bleu de méthylène. A l'aide d'une pipette introduire à proximité du fond quelques gouttes de ce filtrat coloré. Au bout de quelques secondes de manière très spectaculaire, le sédiment se soulève en différents points du fond, laissant apparaître les nasses qui explorent l'environnement. Observer attentivement le mouvement de leurs siphons, organes de leur sens chimique (olfactif et gustatif), qui s'orientent vers les filets d'eau colorés en bleu. Attendre que les nasses se soient enfouies à nouveau pour procéder à différents essais, en utilisant différents liquides alimentaires, sucrés, acides, huileux ou protéinés (bouillon de bœuf ou de poulet, sauce nuocman). Constater que seuls ces bouillons et cette sauce ont quelques effets sur les nasses.
Recommencer l'expérience en déposant un morceau de crevette ou de poisson sur le sable, observer le rassemblement des nasses sur ce morceau de nourriture.
Sur la région antérieure de la coquille de quelques nasses, fixer, en la scellant à la bougie, une grande épingle entomologique, la pointe dirigée vers l'avant du mollusque. Y embrocher un minuscule morceau de crevette ou de poisson. Constater que seules les nasses équipées d'un tel dispositif tournent constamment sur elles-mêmes, en maintenant le plus souvent leur siphon orienté vers l'extrémité de l'aiguille.

Résultats, observations et interprétation

Des stimuli de nature vibratoire ou visuelle ne déclenchent pas le comportement alimentaire des nasses.
Les nasses sont alertées de la présence de nourriture (généralement des cadavres) seulement lorsque des molécules odorantes émises par les chairs des animaux morts parviennent jusqu'à leur siphon. Elles se déplacent alors jusqu'à leur nourriture en s'orientant sur le gradient de concentration des molécules odorantes dans l'eau environnante.



Hidden page

Résultats, observations et interprétation

Par transparence, examiner un réseau de capillaires où circule le sang. Ce dernier, identifiable grâce à ses globules rouges, paraît se déplacer très rapidement (ne pas oublier que la vitesse réelle est multipliée par le grossissement du microscope).

Au niveau des capillaires sanguins, les globules rouges circulent en réalité très lentement.

Voir les capillaires se dilater, se contracter ou la circulation s'arrêter momentanément.

C'est un spectacle sans cesse renouvelé que celui des globules rouges entraînés par le courant sanguin, se tassant à 5 ou 6 de front dans les gros capillaires, se glissant en file indienne, de travers et se déformant dans des capillaires de calibre inférieur à leur diamètre.

Les observer soit de profil, soit de face, se suivant les uns derrière les autres, se bousculant continuellement aux carrefours capillaires *(fig. 28.2)*.

Les petits vaisseaux, artérioles en amont et veinules en aval des capillaires, sont plus larges que les capillaires eux-mêmes. Aussi, peut-on identifier une artériole dans laquelle le sang se dirige vers les capillaires de plus petit diamètre d'où celui-ci est conduit vers une veinule de plus grand diamètre.

Observer et dessiner quelques éléments de cette microcirculation.

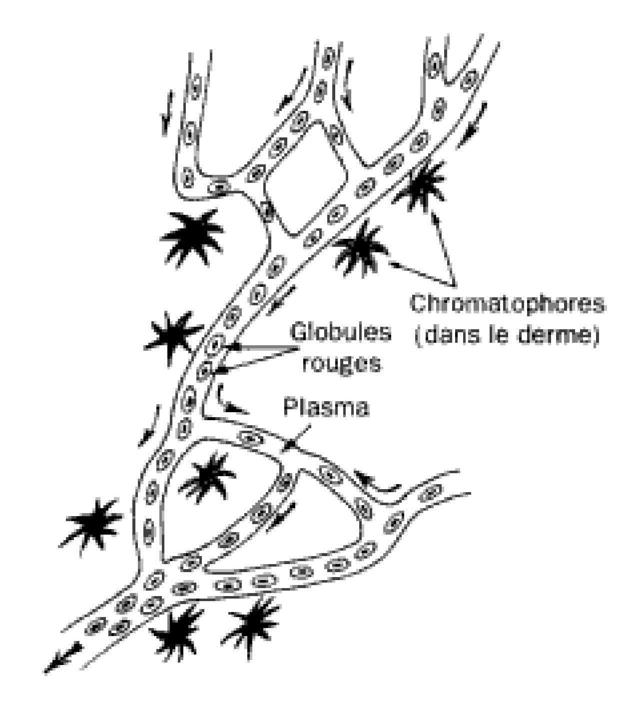


Figure 28.2. Microcirculation dans les vaisseaux capillaires de la grenouille (Amphibiens).

Conclusion

Grâce à leur élasticité et leur contractilité, les capillaires sanguins peuvent modifier leur calibre et participer à la régulation du débit sanguin de façon à répartir au mieux la masse sanguine dans l'organisme.



2. Un élevage de têtards de grenouille

Mots clés

Larve, têtard, métamorphose.

Principe

La phylogenèse des Vertébrés se traduit par une adaptation au milieu aérien.
Suivre, de l'éclosion de l'œuf à la fin de la métamorphose, l'ontogenèse de l'un de leurs représentants, la grenouille (classe des Amphibiens), permet de mieux comprendre les problèmes biologiques posés et les solutions adoptées en vue de vivre en milieu aérien.
Dans ce but, on peut s'efforcer de réaliser un élevage de têtards de grenouille.

Sécurité

Cette manipulation ne présente aucun danger.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

Pontes de grenouille rousse *(Rana temporaria)* (mars-avril) ou de grenouille verte *(Rana esculenta)* (mai-juin), à l'exclusion de toute autre espèce de *Rana* dont la récolte et le transport des œufs, têtards et adultes sont interdits par l'arrêté du 24/04/79 en application de la loi 76-629 du 10/07/76 relative à la protection de la nature.

■ ***Matériel***

- Aquarium.
- Eprouvette.
- Cristallisoir.
- Verres de montre.
- Loupe binoculaire.
- Plantes aquatiques.
- Récipients en verre pour le transport des têtards jusqu'à l'aquarium.
- Gants latex jetables.

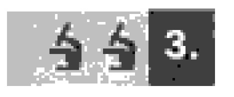
Mode opératoire

■ ***La récolte***

En mai, les œufs pondus par la grenouille verte se trouvent à faible profondeur, dans les ruisseaux et les mares ; l'essentiel du développement post-embryonnaire, qui dure 3 mois environ, se déroule pendant l'été. Les têtards d'assez grande taille sont faciles à étudier.
La grenouille rousse pond en mars-avril ; ses œufs flottent, ce qui est exceptionnel chez les Anoures de nos régions. Les têtards sont de petite taille.
Recueillir les pontes avec une épuisette à mailles fines. Les rapporter du lieu de récolte dans un volume d'eau de la mare suffisant sans les agiter. Les verser ensuite dans un aquarium en prenant soin d'éviter les trop importants décalages de température.

■ ***L'aquarium***

L'aquarium, rempli de 10 à 15 litres d'eau, doit contenir diverses plantes aquatiques récoltées elles aussi dans la mare.
Ne pas négliger l'éclairage pour faciliter la photosynthèse, productrice d'oxygène.
Pour obtenir l'éclosion satisfaisante des œufs, il convient d'assurer une aération convenable de l'eau propre qui les baigne. Il suffit soit de la renouveler constamment par un filet d'eau courante, soit de ne recouvrir les œufs que d'une mince couche d'eau.



3. Recherche du stimulus déclencheur du comportement prédateur de la grenouille

Mots clés

Comportement animal prédateur, stimulus déclencheur, perception visuelle.

Principe

A l'aide de leurres et de proies vivantes présentés à des grenouilles, maintenues en terrarium, montrer les différentes séquences d'une méthodologie expérimentale permettant d'établir que le mouvement de petits objets se déplaçant dans le champ visuel des batraciens est le stimulus déclencheur de leur comportement prédateur.

Sécurité

Il existe un faible risque d'allergie à la peau de grenouille.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

Six grenouilles (trois mâles, trois femelles) du genre *Rana* et, au choix, des espèces *esculenta* (« verte ») ou *temporaria* (« rousse »), achetées chez un éleveur agréé.
Attention aux arrêtés du 24 avril 1979 et du 06 mai 1980 de la réglementation de protection des espèces qui interdisent, en tout temps et en tout lieu sur le territoire national, l'enlèvement, la capture, le transport, la destruction, la mutilation, la naturalisation, le colportage, l'utilisation, la mise en vente, la vente et l'achat d'œufs, têtards ou adultes de grenouilles, à l'exception des espèces *esculenta* et *temporaria*.

■ ***Matériel***

Un terrarium en verre collé de 1 m × 0,5 m × 0,4 m, percé à sa base d'un trou muni d'une bonde d'évacuation reliée à un tuyau souple. Il aura été préalablement aménagé de la manière suivante. Il est recouvert d'un couvercle amovible fait d'un tulle ou d'un fin grillage en matière plastique tendu sur un cadre de bois, s'ajustant aux dimensions du périmètre extérieur du terrarium. Une source lumineuse sera placée au-dessus du bac (attention à ce que le fil d'alimentation et la prise électriques soient à l'abri de l'humidité).
La température ambiante ne devra pas fluctuer au-delà de la plage 18-25 °C. A l'intérieur le fond sera constitué d'un lit de billes d'argile expansée, recouvert de sable de Fontainebleau, lui-même tapissé de mousse des bois. A l'avant, en façade, à gauche, au milieu et à droite, sur une surface d'une dizaine de cm^2, la mousse sera dégagée et remplacée par des plaques de matière plastique pour constituer trois aires de nourrissage à l'arrière desquelles seront enfoncés, couchés, des demi-pots de fleurs en matière plastique, découpés selon leur hauteur. Ils serviront de cachettes aux grenouilles qui ont besoin de s'isoler. A l'arrière, au milieu, la mousse sera également enlevée pour aménager un espace destiné à recevoir un cristallisoir ou une petite cuvette en matière plastique remplie d'eau (sauf dans le cas où ce sont des grenouilles rousses qui sont hébergées) *(fig. 28.4)*.

■ ***Entretien***

Avant d'introduire les grenouilles dans ce terrarium, à réception de celles-ci, vérifier leur état sanitaire et les maintenir en observation pendant 1 semaine dans un plus petit terrarium en matière plastique, au fond tapissé de mousse humide. Afin d'éviter les allergies

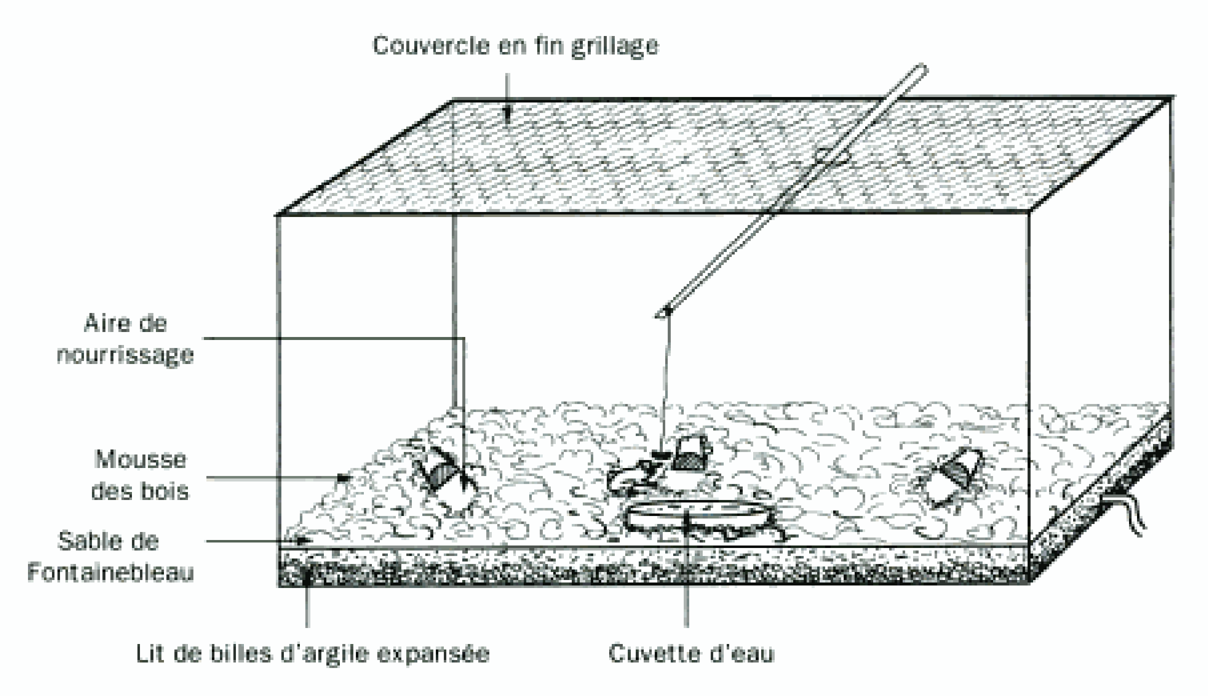


Figure 28.4. Terrarium.

dues aux sécrétions de la peau de grenouilles, manipuler les grenouilles avec des gants et ne pas se toucher le visage (yeux et bouche en particulier). Isoler les batraciens (dans des bacs infirmeries, à fond tapissé de toile d'arrosage, feutre gris à acheter dans un magasin de jardinerie) qui présenteraient des lésions, en particulier autour du nez et aux pattes. Traiter trois fois par jour leur blessure avec du tribrizène non dilué, à l'aide d'un coton tige. Vaporiser d'eau le feutre gris chaque jour. Retirer les grenouilles mortes : le stress de la capture et du transport fragilise beaucoup les batraciens. Placer devant chacune, une seule fois par jour, un ver de farine ou un ténébrion adulte et un grillon vivants nourris de son, mélangé de « Sofcanis », constituant l'apport vitaminique indispensable aux grenouilles. On peut utiliser en secours des asticots blancs et colorés en rouge, achetés chez les marchands d'ustensiles de pêche et d'aquariums. Tous ces insectes peuvent être entreposés au réfrigérateur.

Après 1 semaine, dès qu'elles commencent à se nourrir, placer les grenouilles (sauf celles qui présentent encore des signes de blessures ou de maladies) dans le terrarium d'expérimentation et ne les changer plus de terrarium sauf si elles montrent un signe d'infection.

La peau des grenouilles, lesquelles muent trois fois par semaine, étant extrêmement fragile et sensible aux infections, il est nécessaire de nettoyer la mousse avec un jet d'eau chaque jour, afin d'évacuer par la bonde les déjections (très abondantes) et les restes de mues et d'insectes non mangés. L'eau du cristalloir doit être changée chaque semaine.

Autres accessoires nécessaires :

- un pilulier en verre blanc et son bouchon ;
- une petite boîte en matière plastique opaque, à peu près de même taille que le pilulier, à fond perforé de petits trous avec une épingle et couvercle percé de trous plus gros, avec un clou ;
- une baguette ronde de bois ou de matière plastique de 1 m environ, au bout de laquelle sera attaché un fil de Nylon de 60 cm de long ;
- des papillotes de papier ou de chiffon de différentes couleur, de moins de 5 cm de long.

Mode opératoire

■ ***Observation préliminaire du comportement prédateur***

Repérer un pot occupé par une ou des grenouilles. Déposer à la main (en allant de l'arrière vers l'avant du terrarium) un insecte vivant sur une aire de nourrissage correspondante. Se placer à 0,5 m du terrarium devant la façade. Au bout de quelques instants une grenouille sort. Observer le mouvement de la tête en direction de la proie puis la succession, avec une extrême rapidité, des séquences comportementales suivantes : ouverture de la gueule largement fendue, puis basculement et projection hors de la gueule de la langue bifide et gluante. Collée à la langue fixée à l'avant de la mâchoire inférieure, la proie est aussitôt ramenée dans la gueule et prestement déglutie tout entière. Les nombreuses petites dents de la mâchoire supérieure ne servent, en effet, qu'à retenir la capture.

■ ***Quels sont les sens perceptifs impliqués ?***

• *La vue ?*

De l'arrière du terrarium, agiter devant chaque aire de nourrissage une papillote de chiffon ou de papier attachée au bout du fil tenu par la baguette. Essayer plusieurs tailles, plusieurs formes et plusieurs couleurs. Bien que, de manière aléatoire, le leurre finisse par déclencher le comportement prédateur, les grenouilles qui ont attrapé une ou deux fois le leurre finissent très vite par ne plus y réagir (elles ont appris à discriminer une vraie proie du leurre par la vue, renforcée négativement par le goût, la consistance et/ou l'odeur).

• *L'odorat ?*

Enfermer un insecte vivant (ver de farine, asticot ou jeune grillon) dans le pilulier de verre que l'on placera délicatement couché successivement sur chacune des aires de nourrissage, après l'avoir bien rincé sous l'eau du robinet afin d'éliminer toute trace odorante éventuelle. Remarquer la projection de la langue des grenouilles sur le pilulier, dès qu'un insecte remue à l'intérieur *(fig. 28.5)*.

• *L'ouïe ?*

Enfermer un insecte vivant dans la boîte opaque à couvercle et fond perforés et la disposer doucement successivement pendant 2 minutes sur chacune des aires de nourrissage. Aucune grenouille ne réagit.

Des trois sens décrits ci-dessus, il ressort que le *stimulus déclencheur est de nature visuelle* et semble en première hypothèse être le *mouvement*.

• *Confirmation*

Placer sur une aire de nourrissage un spécimen mort d'insecte congelé et un exemplaire vivant. La grenouille capture l'insecte dès que celui-ci bouge un peu (l'insecte sorti du réfrigérateur reste engourdi pendant quelques secondes aussi longtemps que sa température interne, encore basse, ralentit l'influx nerveux).

Accrocher un grillon congelé ou un ver de farine au bout du fil tenu par la baguette. Agiter doucement devant une autre aire de nourrissage. Une grenouille ne tarde pas à se précipiter sur le leurre.

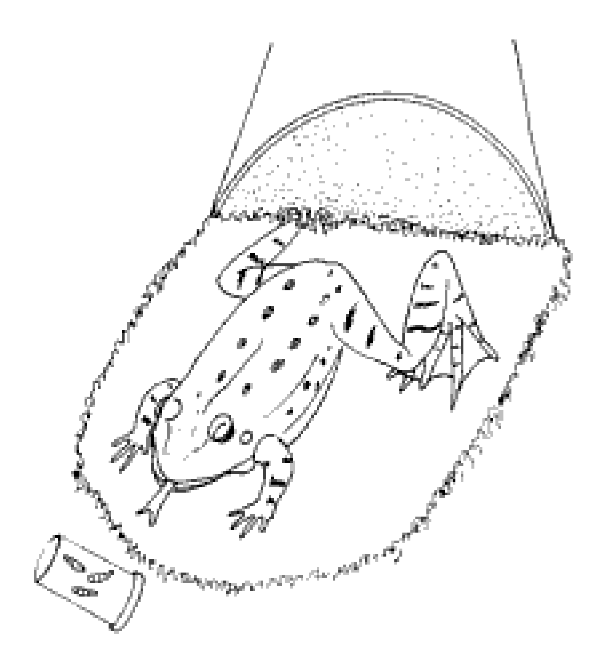


Figure 28.5. Grenouille sur une aire de nourrissage.

■ ***La forme et la couleur jouent-elles un rôle déclencheur ?***
En complément des expériences réalisées dans le premier temps avec les leurres en papier ou en chiffon, on pourra vérifier avec différentes sortes d'insectes vivants que la forme ne joue qu'un rôle réduit. La taille apparente de l'objet en mouvement ne doit pas cependant excéder quelques centimètres. On pourra proposer aux grenouilles successivement sur une aire de nourrissage un asticot vivant blanc et un asticot vivant coloré en rouge et constater qu'ils sont indifféremment capturés tous les deux. La couleur de l'objet, pourvu qu'il soit contrasté sur le fond environnant, ne joue aucun rôle déclencheur.
Attention, pour la santé des batraciens et le renouvellement probant des séances d'expérience d'une journée à l'autre, veiller à ne pas distribuer plus de deux insectes à chaque grenouille par jour. Apprendre dès lors à reconnaître les grenouilles à la taille et à des signes distinctifs !

Résultats, observations et interprétation

Le mouvement d'un objet dans le champ visuel de la grenouille constitue le stimulus déclencheur du comportement prédateur de celle-ci.



Les Poissons

Sommaire

1. L'alevin de truite

Mots clés

Embryon, alevin, vésicule vitelline, corde, tube nerveux.

Principe

Les vertébrés aquatiques (agnathes et poissons) et aériens (amphibiens, reptiles, oiseaux et mammifères) ont un plan d'organisation commun ; en particulier le début de leur développement offre de grandes similitudes.
Cette simplicité originelle est ici envisagée à travers celle d'un poisson osseux, à l'éclosion : l'alevin de truite.

Sécurité

Cette manipulation ne présente aucun danger.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

Des alevins de truite à divers stades de développement. Pour cela, se procurer des « embryons » de truite dans un centre de pisciculture. L'époque de la ponte est variable selon les espèces : la truite ordinaire *(Salmo fario)* pond fin janvier, début février, et la truite arc-en-ciel *(Salmo irideus)* pond seulement en mai.
Il est préférable d'étudier les jeunes individus de cette deuxième espèce, car ils sont plus résistants.

■ ***Matériel***

– Loupe binoculaire.
– Microscope.
– Verres de montre.
– Aiguille lancéolée.

Mode opératoire

A l'éclosion, au sortir de l'œuf donc, le jeune poisson mène une vie libre et autonome et on le désigne sous le nom d'alevin ; il mesure 15 mm de long. A ce moment, l'alevin est transparent et se prête bien à l'observation.
Au bout de 1 semaine, sa taille est de 20 mm et après 2 semaines, de 25 mm. Au cours des 2 semaines suivantes, il y a résorption de la vésicule vitelline et apparition de la pigmentation.
Aussi, ne pas trop attendre pour son observation car sa transparence s'estompe rapidement par suite de sa croissance inévitable en épaisseur et de la mise en place de cellules pigmentaires au sein du tégument.
Placer l'alevin dans un verre de montre avec fort peu d'eau afin que, couché sur le côté, l'animal facilite un examen de profil.
Si les mouvements du jeune animal sont incessants et violents, nuisibles à une bonne observation, il convient de changer l'eau du verre de montre trop appauvrie en oxygène.
Installer le montage sur la platine de la loupe binoculaire. Disposer le tout sur un fond sombre et utiliser un éclairage oblique. Observer ensuite.

Résultats, observations et interprétation

Se rappeler que l'œuf des poissons est riche en vitellus (œuf télolécithe) et la segmentation produit une blastula partielle (discoblastula) qui entoure progressivement le vitellus (les réserves de l'œuf).
L'embryon se forme à l'un des pôles de l'œuf (au pôle animal), aux dépens d'une petite partie de la discoblastula ; le reste, contenant tout le vitellus, forme la vésicule vitelline appendue à la face ventrale de l'embryon *(fig. 29.1)*.

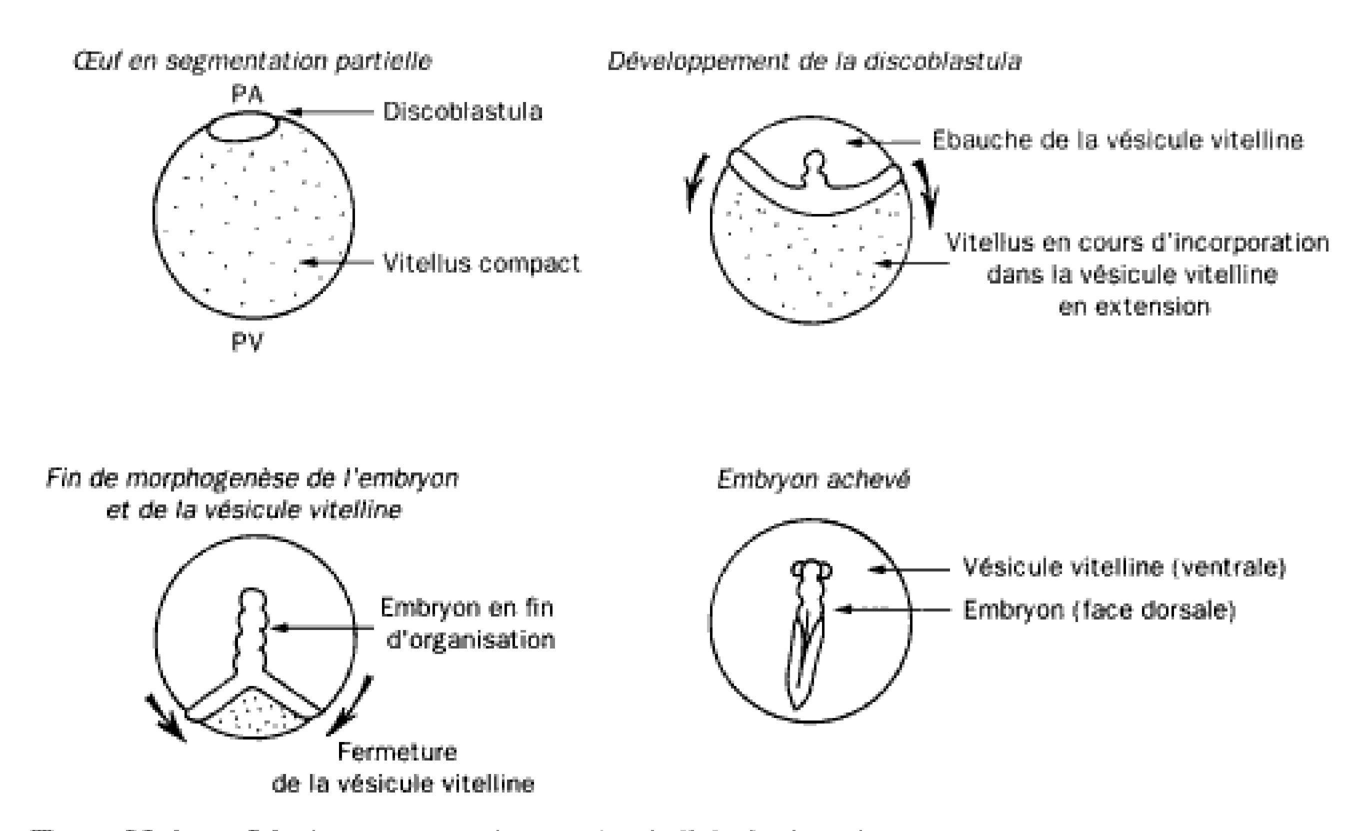


Figure 29.1. Développement embryonnaire de l'alevin de truite.

D'emblée, en examinant l'alevin, on distingue nettement les trois parties du corps d'un vertébré :
- la tête, relativement volumineuse, porte la bouche toujours en action, deux yeux ronds et volumineux, cinq paires de fentes branchiales ;
- le tronc, s'achevant à l'anus, porte la vésicule vitelline sur la face ventrale. On reconnaît à l'intérieur de nombreux globules d'huile et des vaisseaux sanguins. Les nageoires paires pectorales et pelviennes sont déjà présentes et faciles à identifier grâce aux mouvements qui les animent, les nageoires pectorales en particulier ;
- la queue, entourée d'une nageoire impaire, s'incurve vers le haut à son extrémité libre, réalisant une nageoire caudale dissymétrique (ou nageoire caudale hétérocerque).

Remarque : par l'absence d'opercules et par la disposition de la nageoire caudale, l'alevin de truite rappelle un sélacien adulte (un requin, par exemple), les sélaciens étant des poissons cartilagineux considérés comme plus primitifs que les poissons osseux.
Plus précisément, on observe les principaux organes, plus ou moins visibles par transparence *(fig. 29.2)* :
- les centres nerveux avec les cinq vésicules de l'encéphale prolongé par la moelle épinière ainsi que les organes sensoriels ;

– la corde dorsale, premier élément de soutien de l'animal, sous la moelle, autour de laquelle s'installent les corps des vertèbres, ébauche de la colonne vertébrale. Par transparence, elle apparaît délicatement striée dans le sens dorsoventral. Elle est de couleur jaune-crème un peu plus foncée que le reste de l'animal ;
– la musculature, disposée en chevrons réguliers dont la pointe est orientée vers l'avant, traduit la métamérisation musculaire qui s'installe de la tête à la queue ;
– le tube digestif est surtout visible dans les régions antérieure et postérieure. La bouche largement fendue est animée de mouvements constants. Le foie offre l'aspect d'une masse sombre visible sur le côté droit, au-dessus du sac vitellin. L'intestin de couleur jaune forme un tube aboutissant à l'anus, orifice antérieur de la papille abdominale ;
– les fentes branchiales, les branchies n'étant pas encore fonctionnelles et l'opercule non encore formé ;
– le cœur, assez voisin de celui de l'adulte, bat en dessous et un peu en arrière des branchies.

Faire une étude spéciale de la circulation sanguine à l'aide d'une observation directe sur fond blanc. Il s'agit d'un matériel de choix pour comprendre l'organisation sanguine chez un vertébré.

Le sang, revenu des organes, arrive dans le sinus veineux, gagne l'oreillette dont les battements sont visibles à l'œil nu, passe dans le ventricule (partie principale de l'organe) puis dans le bulbe artériel prolongé d'une artère branchiale médioventrale se distribuant en arcs branchiaux.

Au sortir des branchies, se constitue l'aorte dorsale qui, située sous la corde, parcourt toute la longueur de l'alevin et distribue, d'avant en arrière, le sang hématosé aux divers organes.

Au retour, le sang emprunte un trajet veineux (à l'aide des veines cardinales, en particulier) qui le reconduit, d'arrière en avant, au cœur.

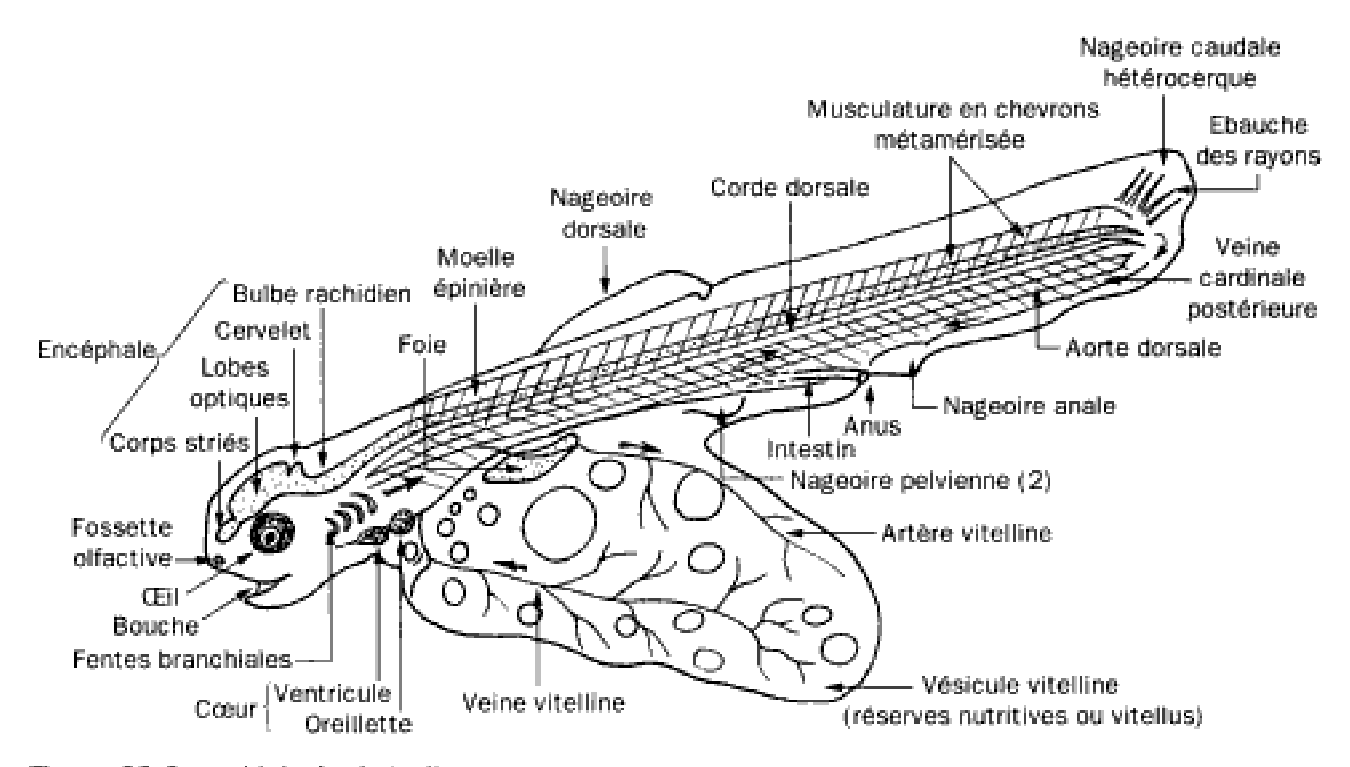


Figure 29.2. L'alevin de truite.

2. Apprentissage et capacité de discrimination visuelle chez le poisson rouge

Mots clés

Apprentissage animal, éthologie, conditionnement skinnérien, renforcement positif, perception visuelle.

Principe

A l'aide des méthodes de conditionnement skinnérien et le comportement de groupe, apprendre à des poissons rouges à discriminer deux signaux colorés pour obtenir leur nourriture.

Sécurité

Veiller à mettre les prises d'alimentation électrique et les interrupteurs hors de l'humidité et des éclaboussures.

Matière d'œuvre

■ ***Modèle biologique***

Douze poissons rouges *(Carassius auratus)* choisis de petite et même taille et de même couleur achetés chez un marchand d'aquarium. Veiller, à l'achat, à ce que les poissons soient bien vifs, non prostrés, et ne présentent aucun signe de maladie, taches sur le corps, perte d'écailles, blessures ou mucus sur les nageoires.

■ ***Matériel***

- Un aquarium de 360 litres de 1,5 m × 0,6 m × 0,4 m.
- Une pompe à air.
- Une pompe filtrante immergée ou extérieure.
- Une rampe d'éclairage fluorescent.
- Nourriture pour poissons d'aquarium en granulés.
- Deux boîtiers multiprises.
- Trois petits entonnoirs.
- Une planche de bois de 1,6 m × 0,1 m, percée sur sa ligne médiane de 3 trous de 1 cm de diamètre, dans lesquels sont introduits les bouts des entonnoirs à 30 et 80 cm des extrémités de la planche. De part et d'autre de chacun de ces trous, on en aménagera deux autres pour fixer sous la planche le nécessaire pour allumer et éteindre séparément un éclairage rouge et un éclairage vert *(fig. 29.3)*. Cette planche est à placer en galerie au-dessus de l'aquarium.
- Six douilles électriques gainées étanches.
- Six interrupteurs.
- Six déflecteurs coniques.
- Six mètres de fil électrique gainé étanche pour les jardins.
- Quelques petits cavaliers de fixation de fils électriques.
- Trois lampes d'éclairage de couleur rouge de 100 W.
- Trois lampes d'éclairage de couleur verte de 100 W.
- Chronomètre (en secondes).

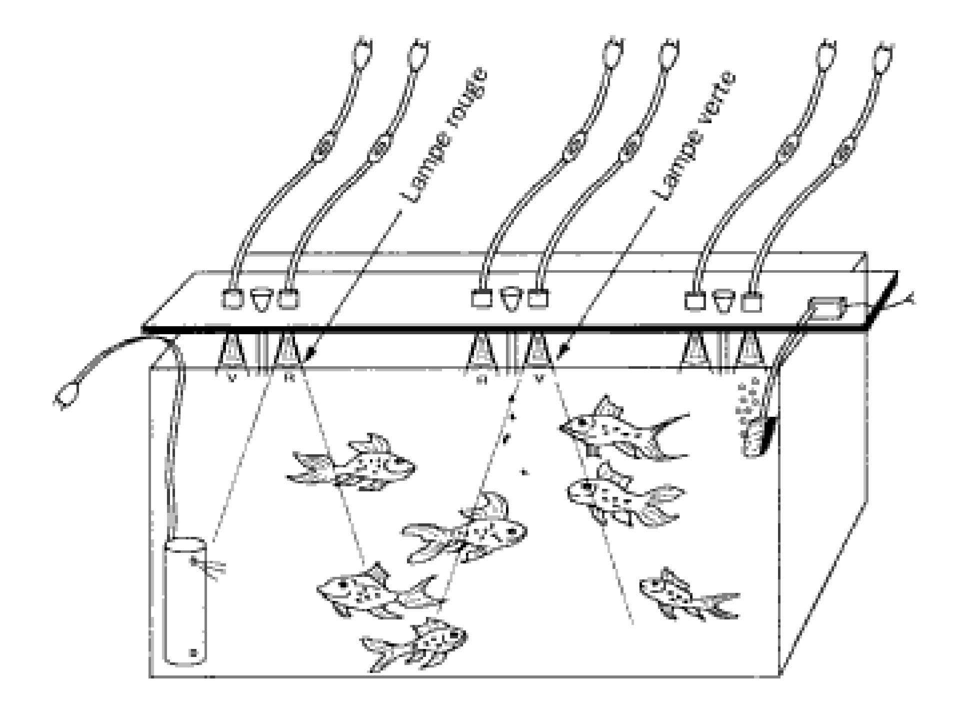


Figure 29.3. Aquarium de 360 litres pour 12 poissons rouges.

Mode opératoire

Laisser jeûner les poissons pendant deux journées complètes.

Après avoir fait une quasi-obscurité dans la salle où se trouve l'aquarium et éteint la rampe fluorescente de l'aquarium, allumer une lampe verte (d'abord celle qui est la plus proche du groupe de poissons le plus grand) et une lampe rouge (autre que celle qui voisine la verte éclairée).

Lorsqu'un poisson entre dans le cône de lumière verte, distribuer des granulés au bout de 10 secondes par l'entonnoir correspondant. Eteindre les lampes au bout de 30 secondes dès que les poissons se sont rassemblés dans le faisceau vert et ont mangé les granulés.

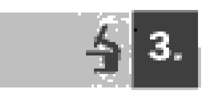
Répéter chaque jour à raison de deux ou trois séquences (séparées de 2 ou 3 heures) de 10 essais (séparés de 30 secondes), d'abord de la même façon que précédemment puis, les jours suivants, en allumant au hasard un éclairage vert et/ou un éclairage rouge, en respectant trois règles que voici. Au cours d'un essai au plus, une seule lampe verte peut être allumée et les deux lampes entourant un même entonnoir ne peuvent s'éclairer simultanément. Enfin pour maintenir la motivation des poissons, il ne peut être distribué plus de 3 g de nourriture par séquence avec un nombre de boulettes toujours inférieur d'une unité au nombre de poissons de l'aquarium.

Noter à chaque essai la date, l'heure, le nombre de poissons qui sont entrés dans le cône lumineux vert et leur temps de séjour, le nombre de poissons entrés dans le cône lumineux rouge et le nombre de poissons qui ne sont entrés dans aucun des cônes lumineux.

Lorsque les poissons sont parfaitement conditionnés (après 1 ou 2 mois) à se rassembler dans les cônes lumineux verts pour obtenir leur nourriture, distribuer les granulés de la journée sans séquence d'éclairage de couleur, d'abord pendant 1 jour puis 2, en augmentant ainsi de plus en plus le temps séparant les séquences de distribution de nourriture, sans signaux colorés, des séquences avec signaux colorés ; on évaluera alors, par la baisse des performances des poissons, l'extinction progressive du conditionnement.

Résultats, observations et interprétation

Les poissons, motivés par la faim et libres de leurs déplacements, mémorisent progressivement, par l'association répétée de la lumière verte dans laquelle est distribuée la nourriture (stimulus conditionnel renforcé positivement) et de la lumière rouge (stimulus neutre inconditionnel) s'allumant au hasard à des emplacements différents de l'aquarium, qu'il leur faut nager vers le signal vert pour satisfaire leur besoin de manger. Par effet de groupe (un poisson a tendance à suivre les déplacements d'un groupe d'autres poissons), l'acquisition de l'apprentissage est facilitée. Il ne s'éteint complètement qu'au bout de plusieurs semaines s'il n'est pas entretenu. Cet apprentissage met en évidence ici les capacités sensorielles de ces poissons à discriminer deux signaux visuels. Cette expérience ne montre pas qu'il discrimine réellement deux couleurs : ces poissons pourraient en effet les distinguer par différence de contraste. Des expériences d'apprentissage plus élaborées, complétant des expériences sur la physiologie rétinienne, ont cependant permis de démontrer que les poissons rouges ont une vraie perception colorée et distinguent réellement des couleurs.



3. Observation de la circulation sanguine d'un poisson

Mots clés

Circulation, sang, poisson, physiologie.

Principe

A l'aide d'un poisson vivant et d'un microscope, la circulation veineuse et artérielle est aisément et directement observable sur la nageoire caudale étalée sans préparation traumatisante pour l'animal.

Sécurité

Cette expérience ne présente aucun risque.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

Guppys *(Lebistes reticulatus)* mâles (reconnaissables à leurs nageoires plus développées que les femelles et à la présence d'un organe copulateur). Il est possible de se procurer très facilement cette espèce prolifique chez un commerçant en matériel et animaux d'aquariologie. A l'achat, veiller à ce que les poissons soient bien vifs, non prostrés, et ne présentent aucun signe de maladie tel que taches sur le corps, perte d'écailles, mucus sur les nageoires ou blessures.

■ ***Matériel***

- Un petit aquarium de maintenance des poissons, équipé d'une rampe lumineuse, d'un aérateur, d'un filtre immergé et d'une résistance thermostatée de chauffage pour aquarium.
- Un microscope grossissant au moins 100 fois.
- Une lame de verre pour microscope.
- Une paille chalumeau pour boisson.
- Un tube de caoutchouc souple de même diamètre que la paille.
- Une pince à réglage de débit.
- Petite épuisette pour aquarium.
- Petit récipient (pot, verre, boîte en plastique, etc.).
- Bracelet élastique.
- Aliment séché pour nourrir les poissons.

■ ***Montage***

Couper un morceau de paille à la longueur du poisson hors nageoire caudale et poncer le bord d'une des extrémités de la paille à l'aide d'une lime à ongle en bois pour éviter de blesser le poisson lors de son introduction ultérieure.

Relier la paille à une extrémité du tuyau en caoutchouc dont l'autre extrémité plongera dans l'aquarium plus haut, à proximité des bulles produites par l'aérateur. Placer et régler la pince à débit de façon à ce que l'eau circule au goutte à goutte dans le siphon ainsi formé.

Capturer délicatement, à l'aide de l'épuisette, un guppy et l'immobiliser rapidement en l'introduisant la tête la première dans la paille.

Fixer la paille au moyen du bracelet élastique sur la lame de microscope et étaler avec un pinceau mouillé la nageoire caudale du poisson sur cette lame *(fig. 29.4)*.



4. Recherche du stimulus déclencheur du comportement agressif du mâle de poisson combattant

Mots clés

Comportement animal, stimulus déclencheur, perception et communication visuelles, poissons, postures agressives.

Sécurité

Aucun risque liée à l'expérience proprement dite.

Principe

A l'aide de poissons vivants et de leurres présentés à des poissons combattants maintenus en aquarium, montrer les différentes séquences d'une méthode expérimentale permettant d'établir que la phase d'intimidation du comportement agressif du mâle de ces poissons (se manifestant par l'écartement des opercules, l'étalement des nageoires et des mouvements du corps) est déclenchée par des signaux de communication visuelle, faisant intervenir, ensemble, forme, mouvements et couleur.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

Sept poissons « combattants du Siam » *(Betta splendens)* adultes de couleur rouge : (6 mâles, 1 femelle), un guppy *(Lebistes reticulatus)*. Il est possible de se procurer très facilement ces espèces chez un commerçant de matériel et d'animaux pour aquariophiles. Veiller, à l'achat, à ce que les poissons soient bien vifs, non prostrés, et ne présentent aucun signe de maladies, tel que taches sur le corps, perte d'écailles, mucus sur les nageoires, blessures, etc.

■ ***Matériel et montage***

- Une étagère à 4 montants et trois planches de 2 m × 0,5 m, espacées de 0,5 m.
- Douze petits aquariums en verre collé de 20 × 20 × 8 cm, servant de bacs d'expérience avec, pour 9 d'entre eux, une face latérale percée à 5 cm du bord haut d'un trou de 8 mm muni d'un tube coudé relié à un tuyau pour l'évacuation du trop plein vers le bac tampon plus bas. Ces 12 aquariums sont à installer sur la planche intermédiaire en 2 rangées parallèles de six : ceux de la rangée en façade comportant tous le système d'évacuation du trop plein alors que seuls les aquariums 1, 3, 4 de la rangée arrière comportent ce système *(fig. 29.5)*.
- Six tubes de verre de trop plein de 8 mm de diamètre.
- Un aquarium en verre collé d'au moins 40 litres, servant de bac tampon et de repos, à placer sur l'étagère inférieure.
- 5 m de tuyau transparent pour aquarium de 15 mm de diamètre et 5 m de tuyau de 8 mm et 9 raccords en T triples, 2 quadruples et 1 simple.
  Ces tuyaux et ces raccords permettront de raccorder le bac tampon au filtre et de distribuer l'eau filtrée aux 6 aquariums d'expériences de la rangée de façade et aux aquariums 1, 3, 4 de la seconde rangée.
- Un bac d'isolement infirmerie de 2 litres, à placer sur l'étagère inférieure.
- Une résistance chauffante pour aquarium, thermostatée à 25 °C, à placer dans le bac tampon.
- Un bulleur avec raccord en croix pour oxygénation du bac tampon et du bac d'isolement.

■ ***Entretien***

Lorsque tout le dispositif est monté et en fonctionnement, remplir les différents aquariums d'eau et laisser circuler l'eau filtrée et chauffée à 25 °C pendant quelques jours avant l'introduction des poissons.
Introduire délicatement les poissons avec une épuisette dans les aquariums d'expériences. Attendre quelques jours avant de commencer les expériences le temps que les poissons, stressés par le transfert, s'acclimatent.
Nourrir les poissons à raison de trois vers de vase, par jour et par spécimen, introduits dans chaque aquarium avec une pipette. Retirer tout poisson mort.
Veiller à isoler dans le bac infirmerie tout poisson présentant un signe de maladie, afin d'éviter la propagation éventuelle de cette maladie. Traiter le poisson à l'aide des produits antiseptiques ou antifongiques appropriés, que l'on introduira aussi à dose préventive dans le bac tampon.
Nettoyer périodiquement les bacs et les tuyaux des algues vertes se développant sur leur paroi.

Mode opératoire

■ ***Observation préliminaire des postures d'intimidation***

Lever pendant 30 secondes le rideau de séparation du premier couple d'aquariums d'expérience.
Dès que les deux mâles s'aperçoivent, ils se dirigent l'un vers l'autre. Ils ouvrent largement leurs opercules et font saillir leurs branchies turgescentes. Ils déplient largement leurs nageoires. Leur livrée prend parfois une teinte plus soutenue et brillante.
Ils se déplacent tête-bêche en exécutant une nage plus ou moins circulaire et en agitant leur nageoire caudale de façon à diriger un courant d'eau vers l'adversaire.
Après cette phase d'intimidation, si les poissons se trouvaient dans le même bac, succéderait une phase d'attaque avec apparition de heurts et de morsures d'abord limitées aux nageoires, puis étendues aux flancs et à la tête. Ces poissons très territoriaux des eaux douces de Thaïlande, appelés pour cette raison « combattants du Siam », sont capables de s'arracher ainsi fragments de nageoires et écailles, et de poursuivre le combat parfois jusqu'à la mort d'un des adversaires, si l'exiguïté de l'espace ne permet pas à l'un des partenaires, rompant le combat en cessant de présenter les postures agressives (fermeture des opercules et repliements des nageoires), de fuir.

■ ***Recherche des stimuli déclencheurs***

S'il semble en première hypothèse que le stimulus déclencheur soit ici de nature visuelle, d'autres stimuli peuvent intervenir tels que des vibrations de l'eau ou des odeurs corporelles (en l'occurrence ici, les poissons étant dans des bacs séparés, il ne peut y avoir de communication olfactive immédiate possible).
Lever le deuxième rideau. Le poisson combattant mâle se trouve devant un bac vide et ne réagit pas. Ce n'est donc ni la vibration causée par la montée du rideau, ni le changement de luminosité sur une face de l'aquarium qui constitue le stimulus déclencheur.
Lever le troisième rideau. Le poisson mâle aperçoit une femelle (de plus petite taille et de couleur plus terne que le mâle). Il réagit en présentant des postures d'intimidation mais de façon moins intense et moins prolongée. Noter les réactions du poisson selon une échelle d'efficacité telle que 0 : absence totale de réponse ; 1 : orientation et nage vers le second aquarium ; 2 : ouverture des opercules ; 3 : étalement des nageoires ; 4 : coups de queue. Pratiquer de même pour toutes les expériences suivantes.



Les Mammifères

Sommaire

Page



1. Etude d'un os long

Mots clés

Epiphyse, diaphyse, périoste, cartilage, tissu osseux.

Principe

Le squelette est un élément essentiel de l'organisation des Vertébrés.

Sécurité

Cette manipulation ne présente aucun danger.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

L'os d'une patte de mammifère : un humérus de veau par exemple que l'on se procure chez le boucher.

■ ***Matériel***

– Scie à métaux.
– Bec Bunsen.
– Solution d'acide chlorhydrique.
– Pinces.

Mode opératoire

Examiner d'abord l'os fraîchement sorti de ses articulations pour définir sa morphologie externe.

Puis, pratiquer une coupe dans l'os de veau *(fig. 30.1A)*. Pour cela, scier longitudinalement la moitié d'un os long de manière à obtenir une épiphyse (ou tête de l'os) avec la diaphyse, partie attenante allongée (ou corps de l'os). On peut utiliser une scie à métaux ou bien commander la pièce osseuse préparée par le boucher.

Il est bon de prévoir également une coupe transversale au niveau de la diaphyse médiane.

Observer à l'œil nu, puis à la loupe à main.

Pour connaître la composition chimique d'un os, procéder aux deux expériences complémentaires suivantes.

– Faire macérer pendant quelques jours, dans un verre à pied ou un petit cristallisoir, un os « propre » de lapin ou de poulet, c'est-à-dire débarrassé de ses ligaments et autres tendons, dans une solution acidulée (1/3 acide chlorhydrique pour 2/3 d'eau) : l'os conserve sa forme, mais devient mou, facile à tordre.
– Placer un autre os, semblable au précédent, dans une flamme vive pendant quelques instants : l'os conserve sa forme, mais est blanc, léger, friable car il est devenu poreux.

Remarque : si l'os est calciné en vase clos, il devient entièrement noir. Le carbone provenant de la calcination de l'osséine imprègne les matières minérales ; on obtient de cette façon du noir animal.

Résultats, observations et interprétation

L'os long présente une zone médiane allongée et assez mince, le corps de l'os ou diaphyse, prolongée aux deux extrémités renflées par les têtes articulaires ou épiphyses, emboîtées et articulées avec les os voisins.

A la surface de la diaphyse, soulever avec la pointe d'un scalpel le périoste, membrane conjonctive fibreuse, fortement adhérente à l'os.
Par sa face interne, le périoste génère du tissu osseux ; ceci confère au périoste la capacité de consolider les fractures par formation d'un bourrelet osseux (ou cal) qui associe les deux fragments d'un os fracturé.
On peut également régénérer une portion d'os manquante ou corriger une malformation osseuse en disposant, en position souhaitée, des fragments de périoste prélevés à la surface d'un autre os. Ces greffes osseuses nécessitent d'ailleurs le prélèvement d'un morceau de périoste accompagné d'une fine couche d'os sous-jacent indispensable à l'ostéogenèse.

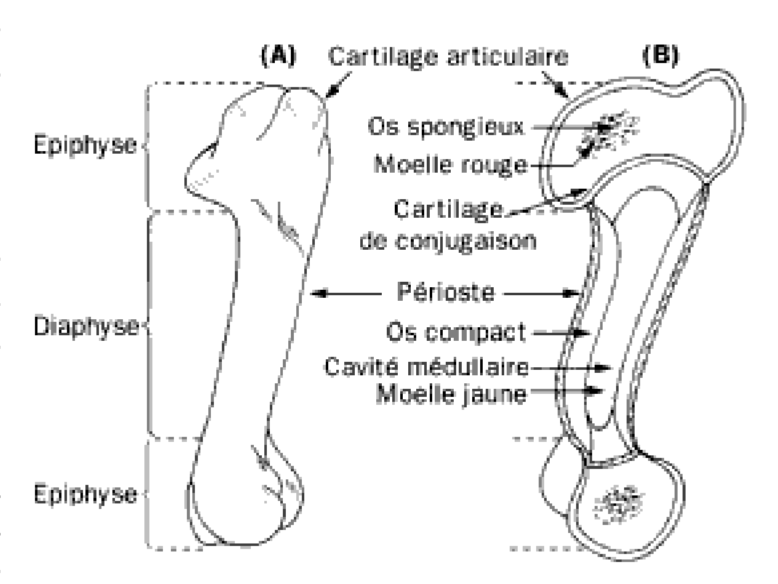


Figure 30.1. Un os long de mammifère.
(A) Vue externe.
(B) Coupe longitudinale.

Les épiphyses sont revêtues d'une couche blanc nacré, luisante à l'état frais, de cartilage articulaire.
A la surface de l'os entier, on peut observer des orifices par où pénètrent les vaisseaux sanguins : les trous nourriciers.

■ ***Examen des coupes longitudinale et transversale d'un os long***
Sur un os de veau coupé *(fig. 30.1B)*, on s'aperçoit qu'un os long est formé de trois zones concentriques, de nature histologique différente :
– la zone superficielle, mince, formée par le périoste (tissu conjonctif fibreux) au niveau de la diaphyse et par les cartilages articulaires lisses et élastiques (tissu conjonctif cartilagineux) au pourtour des épiphyses ;
– la zone moyenne formée de tissu osseux compact (tissu conjonctif osseux de type haversien) ; épaisse dans la diaphyse, sous le périoste qui l'a produite, elle devient très mince sous les cartilages articulaires ;
– la zone centrale, occupée par la moelle :
  – au niveau de la diaphyse, la moelle jaune, riche en graisses, occupe la cavité médullaire axiale continue (d'où l'expression « d'os à moelle ») ;
  – au niveau des épiphyses, la moelle rouge, particulièrement vascularisée en raison de son activité hématopoïétique (elle est en effet à l'origine des éléments figurés du sang), remplit les mailles du tissu osseux spongieux (formé de travées d'os compact délimitant des cavités pleines de moelle rouge).

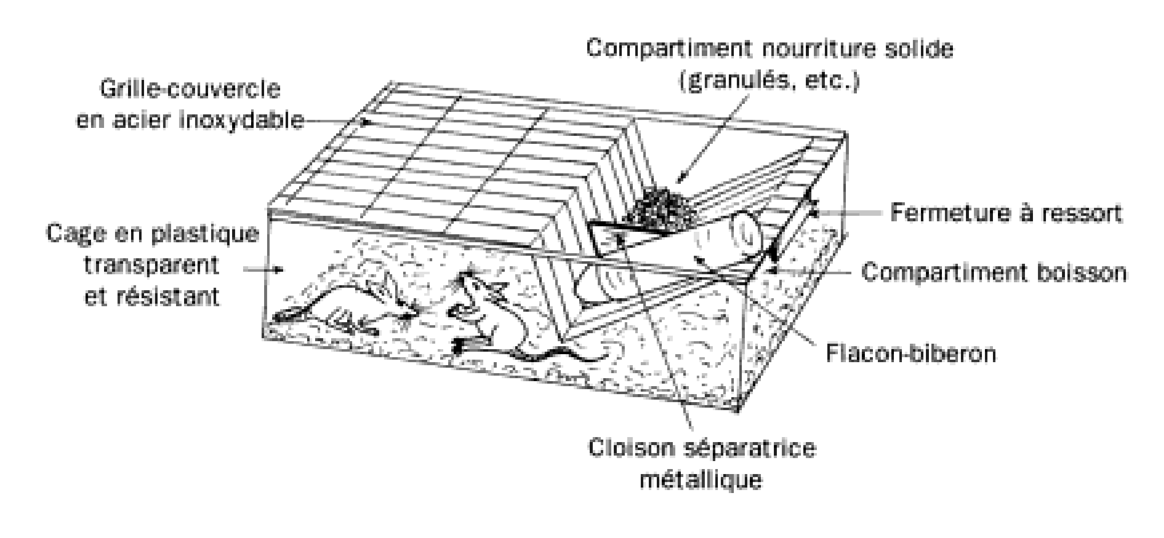
■ ***Examen d'un os jeune, en cours de croissance en longueur***
Sur un os de veau, c'est-à-dire un os appartenant à un jeune individu, on observe aux deux extrémités de l'os long, à la limite diaphyse-épiphyse, les cartilages de conjugaison qui forment un disque d'aspect ondulé.
Remarque : un os cuit dans l'eau bouillante voit ses cartilages de conjugaison devenir de la gélatine. En conséquence, cet os se déboîte facilement en trois morceaux, deux épiphysaires et le troisième diaphysaire.

Chacun des deux cartilages de conjugaison de l'os long se présente comme un disque de tissu cartilagineux qui n'est pas encore envahi par l'ossification ; ses cellules cartilagineuses s'y divisent toujours activement et ainsi l'os s'allonge !
Cependant ce cartilage reste peu épais car, au fur et à mesure de sa croissance, les zones osseuses adjacentes tendent à l'envahir.
Mais l'ossification gagne de vitesse sur l'accroissement du cartilage : dès que les cellules cartilagineuses cessent de se diviser, le cartilage de conjugaison s'ossifie complètement et disparaît. La croissance de l'os long est alors terminée (vers 20 ans dans l'espèce humaine).

■ ***Composition biochimique de l'os***
Après séjour dans l'eau acidulée, l'os est devenu souple et élastique, jaunâtre. Il a perdu les 2/3 de sa masse. Les sels minéraux ont été dissous par l'acide : la matière organique protéique, l'osséine, reste seule.
Quand on calcine un os, il blanchit et devient cassant. L'osséine combustible a disparu (1/3 de la masse osseuse). Il ne reste que les sels minéraux, essentiellement des sels de calcium. Plus précisément, on identifie du phosphate de calcium (85 %), du carbonate de calcium (9 %), du fluorure de calcium (4 %), du phosphate de magnésium.
On peut comparer l'os à du béton armé : l'osséine, de nature conjonctive élastique, constitue une matrice dans laquelle se déposent les sels de calcium. Bientôt, ces derniers « font prise » et englobent ainsi les fibres et cellules osseuses, donnant à l'os la solidité nécessaire à son rôle mécanique.

Conclusion

Le squelette est certes la charpente osseuse et articulée du corps des Vertébrés mais, en plus de son rôle hématogène, il représente une importante réserve minérale, stockée provisoirement et remise en circulation en fonction des besoins de l'organisme, ce qui suggère une régulation minutieuse dans laquelle interviennent de nombreuses glandes endocrines (hypothalamus, hypophyse, thyroïde et parathyroïdes notamment).



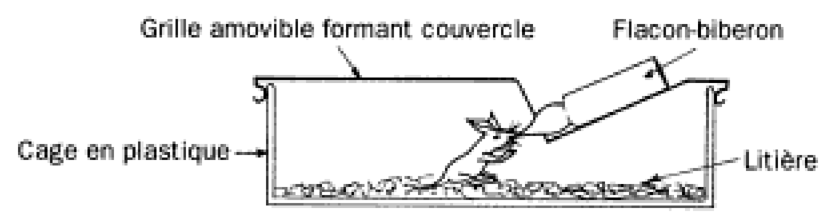


Figure 30.2. Cage à souris d'élevage.

■ ***La litière***
Celle-ci doit être abondante et renouvelée fréquemment. Ses utilisations sont nombreuses : protection contre le froid et la lumière, construction du nid de la femelle, etc.
Elle peut être constituée de sciure en fins copeaux de bois, de foin, de paille ou de morceaux de papier.

■ ***La nourriture***
Un compartiment est prévu à cet effet sur le couvercle incliné à ce niveau.
Elle doit être en quantité suffisante pour éviter le cannibalisme : soit 10 à 15 grammes par jour.
On fournit aux souris :
– de plus en plus souvent des granulés vitaminés, fort commodes d'utilisation ;
– sinon, des Graminées (avoine, blé, orge, etc.), du pain ou des pâtes farineuses, des croûtes de fromage ;
– des végétaux verts et des fruits, très appréciés de ces rongeurs car ils leur apportent de l'eau et fournissent une litière ;
– diverses épluchures de légumes aux vitamines indispensables.
Un flacon-biberon goutte à goutte rempli d'eau est incliné sur le plafond de la cage ; les animaux viennent s'y désaltérer en léchant son extrémité.
Pendant la période d'allaitement des jeunes, donner un peu de lait à la mère.

Résultats, observations et interprétation

L'étude de la souris peut être envisagée dans le but de comparer entre eux les caractères des Vertébrés (poissons, amphibiens, reptiles, oiseaux et mammifères) et de servir d'introduction utile à la connaissance de l'anatomie humaine.
Sa reproduction rapide permet aussi d'avoir une idée juste sur la reproduction des Mammifères (gestation, allaitement).

■ *Présentation*

La souris est un vertébré vivipare dont la peau est recouverte de poils épidermiques *(fig. 30.3A)*. Les femelles présentent des glandes cutanées développées : les mamelles, au nombre de trois paires qui sécrètent le lait, liquide indispensable à la croissance des jeunes dès leur naissance.

Ces deux premiers caractères définissent la classe des Mammifères.

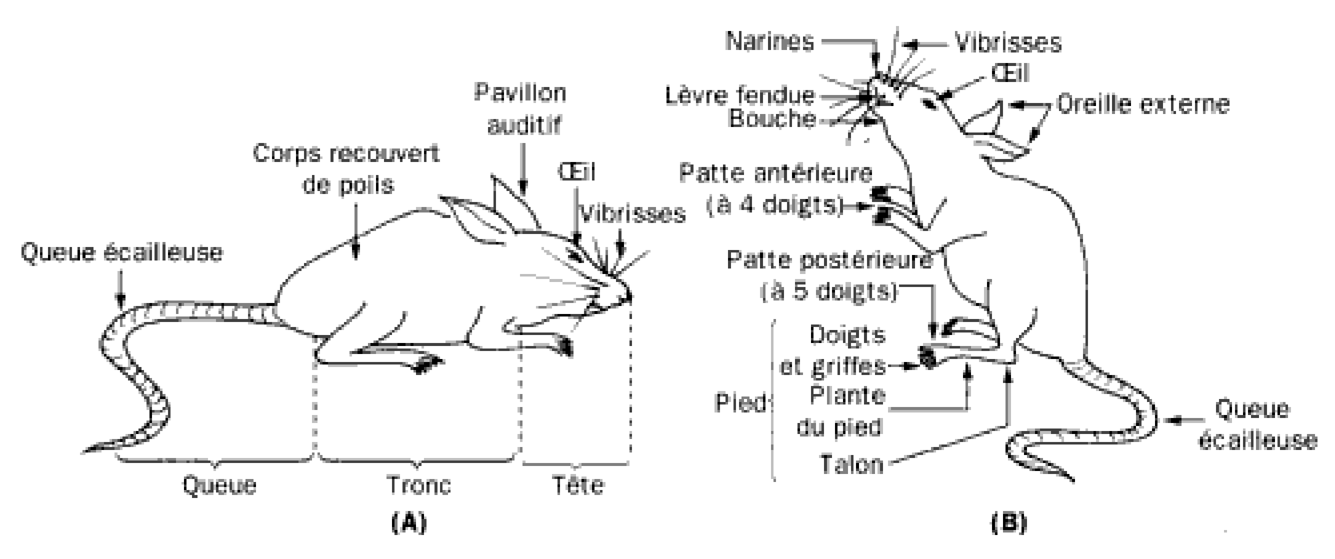


Figure 30.3. Deux attitudes de la souris.

S'y ajoutent d'autres caractères comme la présence de pavillons auditifs mobiles et l'adaptation parfaite à la locomotion terrestre à l'aide de deux paires de membres qui maintiennent en effet le tronc à une certaine distance du sol.

La souris est un rongeur. On peut constater à première vue des incisives au nombre de quatre, recourbées en arc de cercle. Le museau est fendu verticalement jusqu'à la bouche et s'appelle en conséquence le « bec de lièvre ». Les oreilles sont plus courtes que la tête. La queue est par contre presque aussi longue que le reste du corps et est recouverte d'écailles annulaires entremêlées de poils courts.

Il faut noter aussi la présence d'une moustache autour de la bouche, formée de poils raides et sensibles (les vibrisses), de deux yeux de couleur rouge chez la souris blanche (albinos), de deux narines et d'un anus placé sous la queue.

Les orifices génito-urinaires sont situés en avant de l'anus. Chez le mâle, ils sont confondus en un pénis ordinairement rentré dans le ventre ; chez la femelle, l'orifice génital ou vulve est précédé d'un clitoris (ou papille urinaire).

Les pattes antérieures possèdent quatre doigts et les pattes postérieures en possèdent cinq ; les callosités plantaires sont arrondies comme celles des doigts.

En hiver, la souris présente un tissu sous-cutané adipeux particulièrement bien développé dans la région dorsale, qui lui donne un aspect légèrement bossu.

■ *Comportement*

En conditions normales, la souris est souvent assise, reposant sur ses pattes postérieures. Elle affectionne cette position pour grignoter ses aliments qu'elle maintient à l'aide de ses courtes pattes antérieures *(fig. 30.3B)*.

Elle révèle une perpétuelle agitation, semble se hâter en toute circonstance. Elle est par ailleurs très agile : grâce à ses fines griffes, elle grimpe très facilement sur le grillage de sa cage, y compris la tête en bas !

Pendant le repas, l'animal s'installe dans son bac à nourriture et joue de ses incisives, elle ronge ses aliments, toujours sur le qui-vive.
Dans un secteur de son habitation, la souris aménage un lieu de repos. Pour cela, elle réduit en petits morceaux le papier, les morceaux d'étoffe, le coton hydrophile qu'on prend la précaution de mettre à sa disposition ; elle en fait un monticule et aménage ainsi une sorte de logette dans laquelle elle peut se cacher.
Sa propreté lui fait aménager par ailleurs un endroit pour ses déjections.
La souris se reproduit facilement et sa grande fécondité permet d'en obtenir un grand nombre : chaque femelle produit chaque année six portées de six à huit souriceaux.
La gestation dure de 18 à 20-21 jours.
Dans un nid douillet et tapissé de coton aménagé par la mère, les souriceaux naissent nus, sans pelage. Leur peau est rosée, leurs oreilles et leurs yeux sont encore fermés ; ils pèsent 2 grammes !
Leur mère les nettoie à la naissance et chacun trouve une mamelle à sa convenance.
Au 6e jour, les pavillons des oreilles se développent ; la 2e semaine, leurs yeux s'ouvrent et le pelage apparaît.
D'abord alimentés uniquement par le lait maternel, les jeunes souris peuvent être sevrées à 3 ou 4 semaines. Elles deviennent adultes et, par conséquent, aptes à se reproduire à leur tour, à l'âge de 6 à 8 semaines.

Conclusion

Soignée correctement, alimentée à heures régulières de préférence par la même personne, habituée à sa cage, la souris blanche peut s'apprivoiser, répondre à des sollicitations diverses (un bruit, un appel, un aliment particulièrement apprécié, etc.).
Il est alors aisé d'étudier son organisation et son comportement, analyse toujours enrichissante pour l'expérimentateur scientifiquement curieux.

3. L'œil de bœuf

Mots clés

Sclérotique, choroïde, rétine, cristallin, humeur vitrée, nerf optique.

Principe

Grâce aux organes sensoriels, les animaux prennent conscience de leur environnement et organisent leurs déplacements en conséquence.
Par exemple, la peau et ses corpuscules tactiles permettent à l'Homme de reconnaître la nature d'une surface lisse ou rugueuse, de réagir également à des excitations thermiques.
L'oreille détecte les vibrations sonores transmises par l'air.
L'œil est excité par des vibrations électromagnétiques de très faibles longueurs d'onde (0,4 à 0,8 µm) ; il permet de reconnaître à distance la forme des objets et d'apprécier « leur couleur », d'envisager des déplacements faciles et rapides, etc.

Sécurité

Cette manipulation ne présente aucun danger.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***
Œil de bœuf (ou, à défaut, œil de veau, légèrement moins volumineux et plus mou) à se procurer chez le boucher ou le tripier.

■ ***Matériel***
- Scalpel.
- Lame de rasoir.
- Pinces fines.
- Aiguille lancéolée.
- Cuvette à dissection.
- Gants latex jetables.

Mode opératoire

Le globe oculaire du bœuf est extirpé de l'orbite sans beaucoup de précaution ; il est encore entouré de graisse, de lambeaux de muscles, de fragments de paupières, cils et glandes.
Observer, en fonction de la qualité de l'échantillon, quelques cils et les glandes des paupières.
Pour cela, découper une paupière parallèlement à sa surface pour examiner les glandes des paupières (sous forme de petits points jaunes) logées dans la profondeur d'une bande de tissu conjonctif.
Le globe est recouvert d'une membrane fibreuse, blanchâtre et solide, à l'aspect de porcelaine : la sclérotique qui recouvre la quasi-totalité du globe sauf à l'avant où elle est remplacée par une membrane transparente, la cornée, et à l'arrière où elle est traversée par le nerf optique.
En grattant avec précaution la surface de la cornée, on détache une mince membrane transparente : la conjonctive (incolore du vivant de l'animal) qui se prolonge à la surface de l'œil et provient de l'épithélium recouvrant la face interne des paupières.

bien tendre la sclérotique ; poursuivre l'incision avec des ciseaux forts en n'appuyant plus sur le globe oculaire.
L'humeur aqueuse liquide s'échappe par l'ouverture, l'humeur vitrée gélifiée et le cristallin tombent dans la cuvette à dissection *(fig. 30.6)*.
Observer les divers composants de l'œil ainsi dissociés.

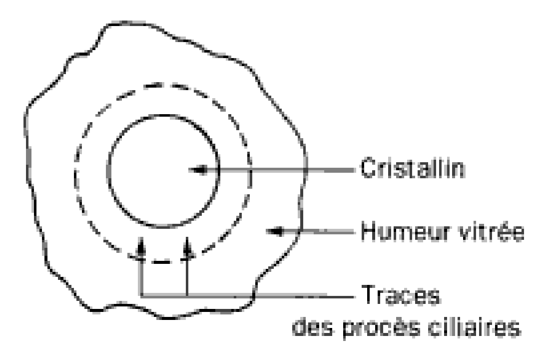


Figure 30.6. Cristallin et humeur vitrée.

Résultats, observations et interprétation

■ ***Hémisphère postérieur***

Examiner d'abord l'hémisphère postérieur dont l'organisation est plus simple *(fig. 30.5)*.
Il contient les trois membranes du globe oculaire qu'on peut facilement individualiser avec une pince fine ou une aiguille lancéolée.
La sclérotique, fibreuse, épaisse et résistante, blanche, est la membrane protectrice du globe oculaire servant de « squelette » aux insertions des muscles moteurs de l'œil.
La choroïde pigmentée de noir (mélanine) est la membrane nourricière de l'œil, riche en vaisseaux sanguins. Dans le fond de l'œil, elle présente, sur sa face interne (face visible directement), un aspect original brillant à reflets bleus et verts : cette région est le tapis, vivement irisé.
La rétine est la membrane sensorielle et photochimique de l'œil. De couleur gris jaunâtre, elle recouvre la choroïde. Au point où s'épanouit le nerf optique, elle présente une tache claire, le point aveugle ainsi nommé car dépourvu de cellules nerveuses visuelles. Par ce point, en effet, partent les vaisseaux sanguins rétiniens qui pénètrent dans l'œil avec le nerf optique.

■ ***Hémisphère antérieur***

Observer ensuite l'hémisphère antérieur dans lequel on retrouve les trois membranes précédentes (à l'aide d'une pince, vérifier à nouveau leur indépendance relative) *(fig. 30.5)*.
En avant, la choroïde se « détache » de la sclérotique pour former les procès ciliaires, ensemble de replis rayonnants de couleur pigmentée dont la musculature intervient dans l'accommodation du cristallin permettant la formation des images sur la rétine centrale.
En avant des procès ciliaires, la choroïde forme un second repli, l'iris, délicat rideau circulaire tendu au sein des milieux transparents oculaires dont la face postérieure (visible ici) est concave et de couleur foncée.
Sa paroi comporte une musculature lisse constituée de fibres radiales et circulaires. Perforé en son centre de la pupille elliptique, l'iris en règle le diamètre et contrôle ainsi la largeur du faisceau de lumière qui pénètre dans l'œil ; il fonctionne à la manière d'un diaphragme d'appareil photographique.

■ ***Milieux transparents***

D'avant en arrière de l'œil, sens suivi par les rayons lumineux, se rencontrent la cornée transparente, l'humeur aqueuse, le cristallin et l'humeur vitrée *(fig. 30.7)*.
La cornée est le prolongement transparent de la sclérotique.
L'humeur aqueuse, liquide incolore limpide comme de l'eau, remplit la chambre antérieure de l'œil (chambre claire de l'œil) entre la cornée et l'iris. Elle a été sécrétée par les procès ciliaires ; elle s'est écoulée lorsque le cristallin s'est détaché et est tombé dans la cuvette.
Le cristallin est une lentille biconvexe dont la courbure est plus accentuée sur la face postérieure ; il est maintenu en place par des fibres constituant le ligament suspenseur.

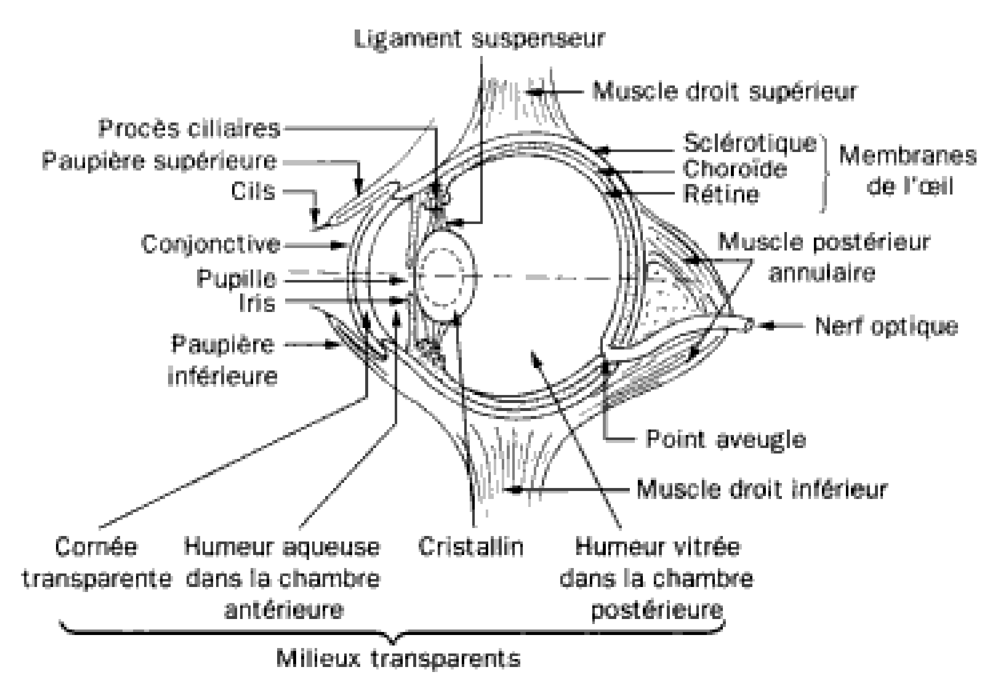
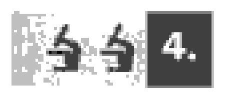


Figure 30.7. Coupe sagittale du globe oculaire.

Si l'échantillon est très frais, le cristallin est parfaitement limpide, élastique et souple.
Remarque : pratiquer une coupe dans le cristallin : le centre apparaît plus dur que la périphérie formée d'écailles souples et emboîtées correspondant à des couches d'un tissu transparent et élastique.
Le cristallin est totalement dépourvu de nerfs et de vaisseaux, ce qui lui assure sa transparence particulière ; sa nutrition est assurée par les procès ciliaires.
L'humeur vitrée, masse gélatineuse et transparente elle aussi, occupe la chambre postérieure de l'œil (chambre noire). Elle possède le même indice de réfraction que l'eau. Si l'on verse de l'eau dans la cuvette à dissection, l'humeur vitrée cesse d'être visible !
Par contre, le cristallin plus réfringent ($n = 1{,}43$) apparaît nettement.
En résumé, le globe oculaire comporte trois membranes : la sclérotique, la choroïde et la rétine, et des milieux transparents : la cornée transparente, l'humeur aqueuse, le cristallin et l'humeur vitrée.

Conclusion

L'organisation d'un globe oculaire est pratiquement la même dans la série des Vertébrés. Au sein des mammifères, l'œil de l'Homme se distingue de l'œil du bœuf uniquement par les petites différences apparentes suivantes : une forme sphérique, une cornée transparente arrondie, une pupille circulaire et une choroïde entièrement noire.



4. Le cœur de mouton

Mots clés

Oreillette, ventricule, artère, veine, coronaire.

Principe

Mettre en évidence l'organisation d'un cœur de mammifère avec ses cavités et ses valvules dont le fonctionnement coordonné définit la révolution cardiaque.

Sécurité

Cette manipulation ne présente aucun danger.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

Il est recommandé de se procurer un cœur de mouton accompagné des poumons (les gros vaisseaux sont faciles à observer) chez le boucher ou le tripier.

■ ***Matériel***

– Cuvette à dissection.
– Pinces fines et grosses pinces.
– Scalpel.
– Sonde cannelée.
– Coton hydrophile.
– Gants latex jetables.

Mode opératoire

■ ***Orientation de l'échantillon***

• *Face artérielle ou ventrale*

Orienter le cœur la pointe en bas ; cette dernière définit l'extrémité postérieure de l'organe. Les gros vaisseaux occupent la partie antérieure ou « base » du cœur, bien visibles sur la face ventrale appelée, pour cette raison, face artérielle. Cette face est parcourue par un sillon interventriculaire oblique de droite à gauche *(fig. 30.8A)*.

Enfoncer la sonde cannelée dans les vaisseaux béants qui surplombent cette face ventrale ; si la sonde atteint sans le moindre obstacle la pointe du cœur, elle a été introduite dans l'aorte. Si la sonde reste sur le côté gauche de la face artérielle, elle a été engagée dans le tronc pulmonaire.

Le cœur est recouvert de masses graisseuses, plus ou moins abondantes selon les individus, surtout installées dans la région antérieure et les sillons. Ne pas essayer de retirer tout ce tissu adipeux, mais dégager dans la région antérieure les oreillettes et les gros vaisseaux jusqu'à leur base.

Cette opération préliminaire est obligatoire pour envisager la réussite de la manipulation.

Ne pas utiliser un instrument pointu (scalpel ou autre) pour éviter une détérioration des vaisseaux ; en tirant avec les doigts, bien dégager les vaisseaux en éliminant ainsi la graisse et le conjonctif d'emballage.

Dessiner ensuite cette face et porter les indications de la *figure 30.8A*.

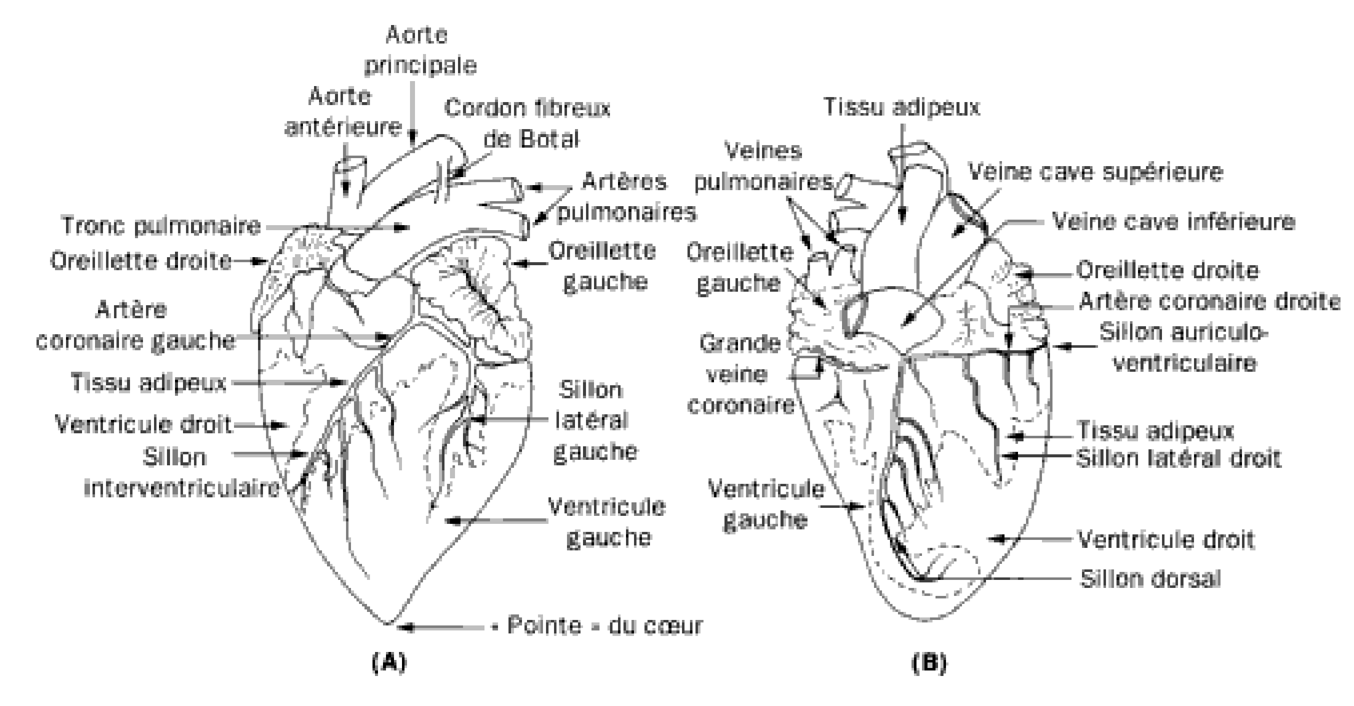


Figure 30.8. Morphologie externe du cœur de mouton.
(A) Face ventrale (« artérielle »).
(B) Face dorsale (« veineuse »).

• *Face veineuse ou dorsale*

Retourner le cœur sur la face dorsale. Constater que le sillon auriculoventriculaire est bien visible.

Pour identifier les veines caves, prendre comme point de repère le noyau graisseux de l'oreillette droite ; à sa droite s'ouvre la veine cave supérieure. Y introduire la sonde cannelée dont on oblique l'extrémité à gauche sous le noyau graisseux ; la sonde sort par l'orifice de la veine cave inférieure *(fig. 30.8B)*.

Retirer un peu la sonde et la renfoncer un peu en dessous et parallèlement au sillon auriculoventriculaire : elle pénètre alors dans la grande veine coronaire.

Quant aux orifices des veines pulmonaires, ils se présentent en nombre variable (de 0 à 4) selon le niveau de la section réalisée dans l'oreillette gauche par le boucher.

Dessiner la face veineuse du cœur en suivant les indications portées sur la *figure 30.8B.*

■ ***Ouverture de la cavité ventriculaire droite***

Face artérielle au-dessus, couper longitudinalement le tronc pulmonaire et reconnaître, à cette occasion, les trois valvules sigmoïdes : essayer de passer entre deux d'entre elles *(fig. 30.9A)*.

Prolonger l'incision dans la paroi myocardique du ventricule droit, aussi près que possible du sillon interventriculaire ; écarter les lèvres de l'ouverture ainsi réalisée : à cet effet, il convient de sectionner le muscle transversal.

Dessiner le ventricule droit ainsi ouvert. Bien faire apparaître la cuspide antérieure de la valvule auriculoventriculaire.

■ ***Ouverture de la cavité ventriculaire gauche***

Ouvrir l'aorte et, comme précédemment, couper si possible entre deux sigmoïdes. Continuer le découpage de l'épaisse paroi myocardique gauche, le plus près possible du sillon interventriculaire jusqu'à l'extrémité de la pointe du cœur.

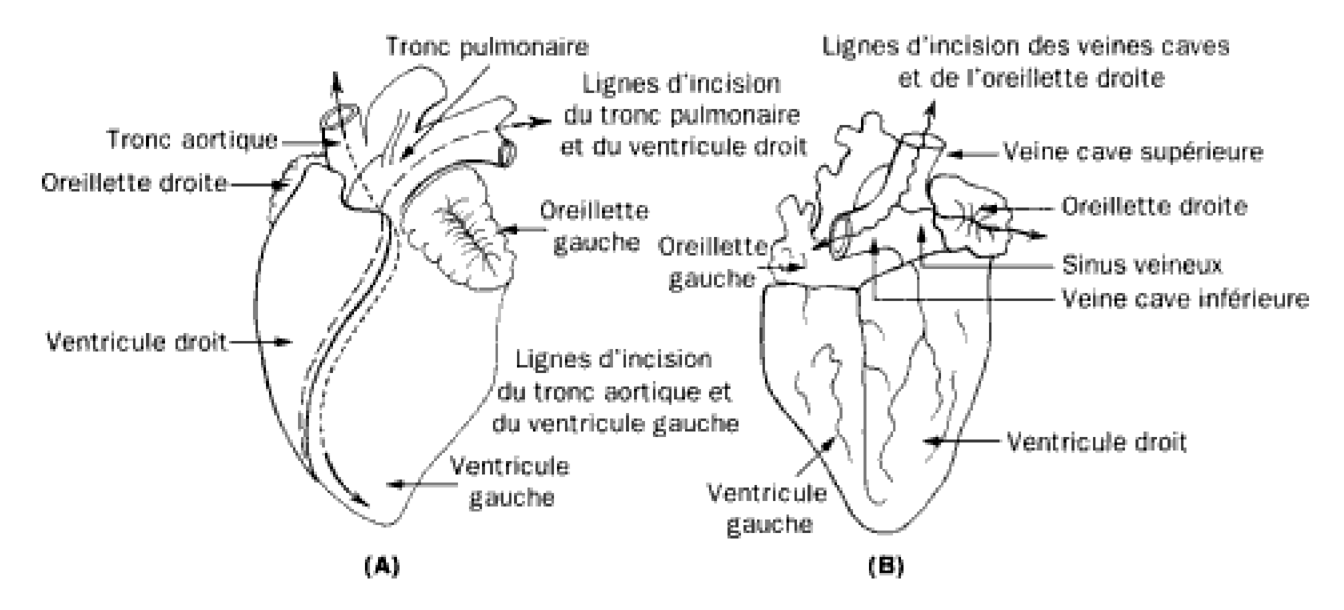


Figure 30.9. Tracé des lignes d'incision des ventricules et de l'oreillette droite.
(A) Face ventrale.
(B) Face dorsale.

Ecarter les lèvres de cette incision en coupant les faisceaux de fibres transversales qui unissent encore les parois du ventricule.
Dessiner le ventricule gauche ainsi entrouvert en mettant en évidence, ici encore, la valvule auriculoventriculaire.

■ ***Ouverture de l'oreillette droite***
Introduire la sonde cannelée dans l'une des veines caves et faire ressortir son extrémité par l'autre veine cave *(fig. 30.9B)*.
Pratiquer une première incision suivant la ligne définie par la sonde cannelée et une seconde incision perpendiculaire, de façon à nettement dégager la cavité de l'oreillette droite.
Remarque : effectuer l'ouverture de l'oreillette gauche d'un large coup de ciseaux.
L'étude du cœur des mammifères peut être favorablement complétée par une série de coupes transversales. L'une d'elles effectuée au-dessus de la pointe du cœur fait constater la très grande dissymétrie des ventricules.

Résultats, observations et interprétation

■ ***Organisation externe***
Les sillons dorsal et ventral séparent les deux moitiés droite et gauche du cœur (ou hémi-cœurs droit et gauche) qui ne présentent pas de communication. La « pointe » fait partie de l'hémi-cœur gauche.
Chaque hémi-cœur comporte une oreillette où aboutissent les veines et un ventricule d'où partent les artères.
Sa paroi musculaire ou myocarde contient son propre réseau vasculaire, le système coronaire.
Les artères à paroi épaisse, blanchâtres, béantes et élastiques, s'opposent aux veines aplaties à paroi moins épaisse et flasque.
Distinguer le tronc artériel pulmonaire d'avec l'aorte : tous deux sont associés par le cordon fibreux de Botal, vestige du canal de Botal fonctionnel durant la vie fœtale.

Si le tronc pulmonaire n'est pas coupé trop près du cœur, observer ses deux branches ou artères pulmonaires (chacune irriguant un poumon).
L'aorte dorsale porte le départ d'une artère également importante, l'aorte antérieure.
Remarque : chez le mouton, en effet, l'aorte antérieure forme un tronc vasculaire commun aux artères brachiales et céphaliques. Chez l'Homme, on note une légère différence : l'artère carotide gauche (irriguant une partie de la tête) et l'artère sous-clavière gauche (irriguant le bras gauche) ont chacune leur origine propre sur la crosse aortique de l'aorte dorsale. Par contre, la carotide droite et l'artère sous-clavière droite ont une courte origine commune : le tronc brachiocéphalique, ce qui introduit une certaine dissymétrie vasculaire.
Enfoncer la sonde cannelée (ou le manche d'un scalpel) dans l'aorte pour vérifier sa communication avec le ventricule gauche. Ainsi, l'aorte conduit le sang hématosé du ventricule gauche vers les organes (circulation générale).
Observer les veines sur la face dorsale : elles sont moins visibles que les artères car très souvent sectionnées, par le boucher, trop au ras des oreillettes.
En cas favorable cependant, examiner les deux veines caves antérieure et postérieure qui pénètrent dans l'oreillette droite. La sonde cannelée, introduite dans une veine cave, traverse l'oreillette droite et aboutit au ventricule droit.
Ainsi, le sang carbonaté recueilli à la sortie des organes rejoint l'oreillette droite par les deux veines caves.
Dans l'hémi-cœur gauche, les veines pulmonaires en principe au nombre de quatre (deux par poumon) aboutissent à l'oreillette gauche ; mais trop souvent on n'observe qu'un seul orifice car elles sont sectionnées trop au ras de l'oreillette gauche. Ce vaste orifice marque cependant l'emplacement du point d'aboutissement des veines pulmonaires dans l'oreillette gauche.
A titre de vérification, la sonde cannelée (ou le manche d'un scalpel), enfoncée dans cette ouverture, traverse l'oreillette et atteint le ventricule gauche, à proximité de la pointe du cœur.
Ainsi, le sang hématosé au niveau des poumons revient au cœur par les veines pulmonaires (circulation pulmonaire).
Remarque : comme tout muscle strié squelettique, le cœur est un muscle qui est ravitaillé en nutriments par son irrigation coronaire spécifique. Le sang hématosé riche en oxygène circule dans deux artères coronaires, la gauche localisée essentiellement dans le sillon ventral, la droite dans le sillon dorsal.
Le sang chemine ensuite dans de petits vaisseaux installés dans les sillons cardiaques avant de confluer dans une veine coronaire qui débouche dans la veine cave postérieure.

■ ***Organisation interne***

• *Examen du ventricule droit*

L'oreillette et le ventricule communiquent par un orifice auriculoventriculaire délimité par la valvule tricuspide. Celle-ci est formée de trois lames membraneuses (ou cuspides) orientées vers le ventricule et rattachées par des cordes tendineuses très solides à des reliefs de la paroi ventriculaire ou piliers musculaires *(fig. 30.10)*.
Cette valvule tricuspide empêche le retour du sang vers l'oreillette lorsque le ventricule se contracte.
Si la veine cave postérieure est conservée en bon état, il est possible de voir l'orifice de la veine coronaire s'ouvrir sous cette veine cave.
Au débouché du ventricule dans le tronc pulmonaire, s'observent les valvules sigmoïdes pulmonaires conçues pour faciliter l'éjection du sang ventriculaire.

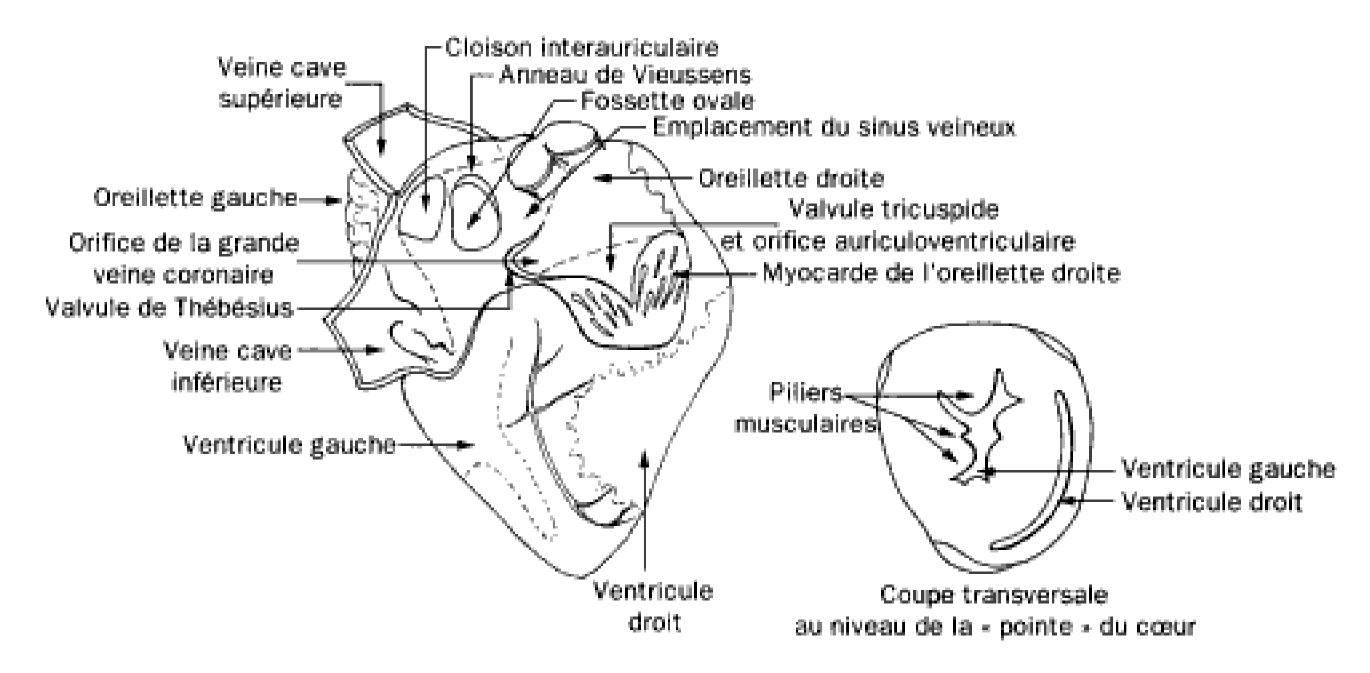


Figure 30.12. Organisation de l'oreillette droite.

• *Examen de l'oreillette droite.*

L'oreillette droite, surtout, est digne d'intérêt. Sa paroi est mince et sa face interne présente deux régions bien distinctes *(fig. 30.12)* :

– la région sinusale, totalement lisse, correspond au sinus veineux des amphibiens par exemple. Elle reçoit les deux veines caves ainsi que la veine coronaire dont l'ouverture est limitée par la valvule de Thébésius ;
– la région auriculaire, proprement dite, est garnie d'un réseau de colonnettes musculaires (« charnues »).

La cloison interauriculaire porte une zone déprimée appelée fossette ovale, partiellement entourée d'un bourrelet : l'anneau de Vieussens. Cette fossette ovale correspond au trou de Botal qui, chez le fœtus, faisait communiquer les deux oreillettes.

Conclusion

Véritable pompe aspirante et foulante automatique, le cœur est l'organe moteur qui entretient le mouvement du sang dans le système circulatoire.

Il est alternativement à l'état de contraction (ou systole) et de relâchement (ou diastole). Sur un cœur en activité, se succèdent la systole des oreillettes, puis la systole des ventricules avec relâchement des oreillettes et, enfin, la diastole générale. Ces trois phases qui s'enchaînent toujours dans le même ordre définissent une révolution cardiaque dont la fréquence est régulée par des influences centrales nerveuses et hormonales de façon à satisfaire, à chaque instant, les besoins en sang de l'organisme.

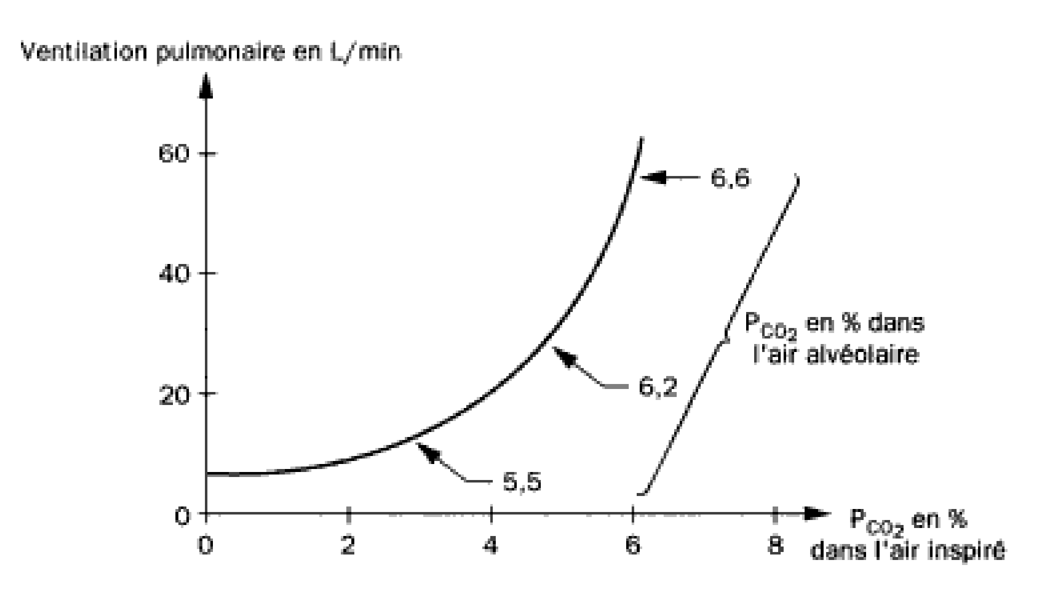


Figure 30.13. Variation de la ventilation pulmonaire en fonction de la teneur en CO_2 de l'air inspiré.

Les résultats qu'il obtient sont représentés sur le graphe de la *figure 30.13*.
De la même manière, Haldane démontre que les variations de la P_{O_2} de l'air inspiré modifient relativement peu le débit ventilatoire. Un sujet respirant dans un spiromètre en circuit fermé dans lequel le CO_2 expiré est absorbé par de la chaux sodée ne présente pas d'hyperventilation tant que le gaz inspiré contient plus de 14 % d'oxygène (la teneur de l'air normal est égale à 21 %).

Conclusion

La teneur en CO_2 de l'air inspiré est le facteur chimique régulant la fréquence respiratoire.
Le principe du carbogène est fondé sur cette propriété. Le carbogène est un mélange gazeux constitué de 93 % d'O_2 et 7 % de CO_2, utilisé pour la réanimation des noyés. L'inhalation de carbogène provoque l'hyperventilation.



6. Etude des échanges gazeux respiratoires chez le rat

Principe

L'intensité respiratoire est le volume de dioxygène absorbé ou le volume de dioxyde de carbone rejeté (les mesures sont faites dans les conditions normales de température et de pression) par heure, rapporté à l'unité de masse corporelle de l'animal.
Le quotient respiratoire est le rapport du volume de dioxyde de carbone rejeté au volume de dioxygène absorbé, pendant le même temps, les mesures étant faites dans les mêmes conditions de température et de pression :

$$QR = \frac{\text{Volume de } CO_2 \text{ rejeté}}{\text{Volume d'} O_2 \text{ absorbé}}$$

L'intensité respiratoire varie avec l'exercice musculaire et l'activité de nombreuses fonctions physiologiques : digestion, régulation thermique, etc.
Le quotient respiratoire varie avec la nature des nutriments consommés par les tissus de l'animal : glucides, lipides ou protides.
Dans cette expérience, la mesure de l'intensité respiratoire est réalisée par une méthode manométrique en circuit fermé, le volume d'oxygène absorbé par l'animal est mesuré tandis que le dioxyde de carbone est fixé par de l'hydroxyde de sodium.
Cette expérience présente un certain nombre d'inconvénients qu'il est difficile de surmonter :
- variation des volumes gazeux avec la température de l'expérience ;
- variation de la composition de l'air inspiré ;
- variation du volume et de la pression de l'atmosphère contenue dans l'enceinte.

Le calcul du quotient respiratoire nécessite la mesure des volumes de dioxygène et de dioxyde de carbone échangés, dans les mêmes conditions, pendant la durée de l'expérience. Pour la détermination de la mesure de l'intensité respiratoire, on a mesuré le volume de dioxygène absorbé par un rat pendant 30 minutes.
Dans une seconde expérience, réalisée en substituant au volume de lessive de soude concentrée (hydroxyde de sodium) le même volume d'eau, on mesure la résultante des échanges gazeux : volume de dioxygène consommé moins volume de dioxyde de carbone rejeté. Des résultats de la première et de la seconde expérience, on déduit le volume de dioxyde de carbone rejeté.
La valeur de QR est en moyenne de 0,85 pour un régime alimentaire mixte ; ses valeurs théoriques sont égales à 1 si les glucides seuls sont dégradés, 0,71 dans le cas des lipides et 0,81 dans le cas des protides.

Sécurité

L'hydroxyde de sodium (lessive de soude) est un produit corrosif, placé dans la classe 2 de la classification toxicologique helvétique (poison très puissant). Sa manipulation nécessite le port de lunettes de protection et d'une blouse de coton fermée.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***
Un rat.

■ ***Réactifs***
– Lessive de soude (solution concentrée d'hydroxyde de sodium).
– Liquide manométrique : eau teintée de bleu de méthylène.
– Solution de rouge de méthyle à 0,1 g dans 100 mL d'éthanol à 96 volumes.
– Solution d'acide chlorhydrique 0,1 mol/L.

■ ***Matériel***
Le respiromètre : enceinte constituée d'un dessiccateur de 6 litres de capacité, comportant de préférence un rodage latéral en plus du rodage supérieur. La chambre de l'appareil est branchée sur un manomètre à eau par l'intermédiaire d'un robinet à trois voies *(fig. 30.14)*.

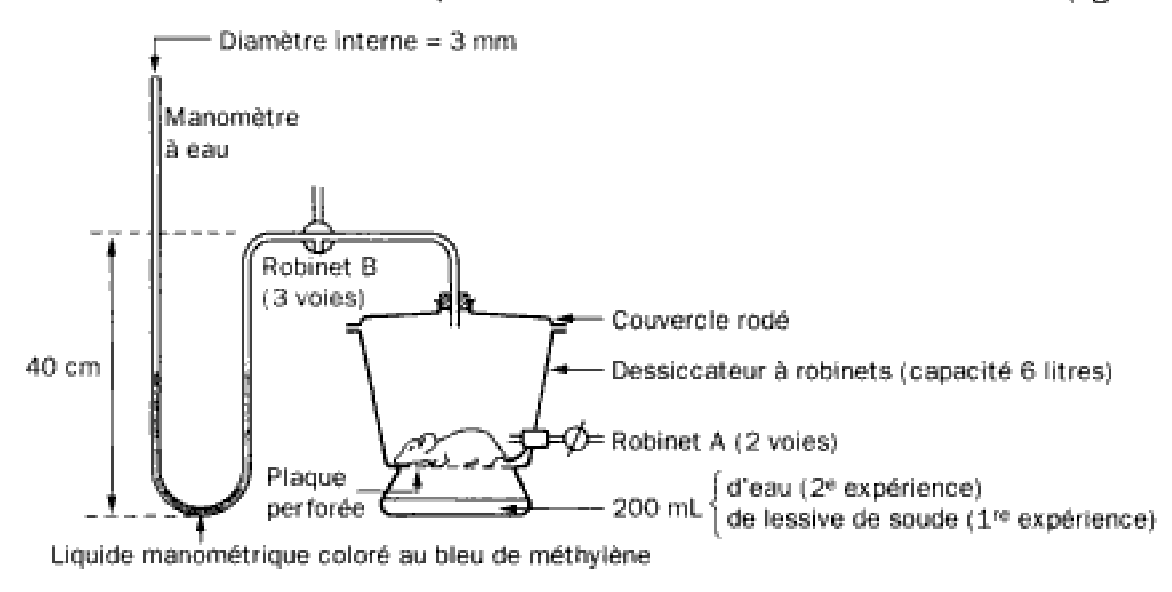


Figure 30.14. Dispositif de mesure d'une intensité respiratoire (respiromètre).

Mode opératoire

■ ***Mesure de l'intensité respiratoire***
Peser l'animal.
Verser dans le fond du dessiccateur 200 mL de lessive de soude (solution concentrée d'hydroxyde de sodium).
Introduire le rat dans le dessiccateur, les robinets A et B étant en communication avec l'extérieur (il s'établit alors une circulation d'air, évitant la confination de l'atmosphère avant l'expérience).
Attendre 15 minutes que l'équilibre thermique soit réalisé.
Fermer le robinet A et, à l'aide du robinet B, mettre en communication le manomètre et la chambre du respiromètre.
Noter le temps qui devient le temps zéro. Attendre 30 minutes.
Fermer le robinet B. Noter la dénivellation H *(fig. 30.15)*.
Ouvrir le dessiccateur et sortir le rat qui est replacé dans une cage pendant une quinzaine de minutes.

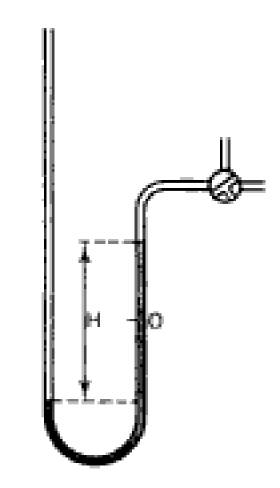


Figure 30.15. Dénivellation du liquide manométrique.

■ ***Calculs*** (voir le *tableau 30.I.*)

■ ***Mesure du quotient respiratoire***
Vider le fond du dessiccateur des 200 cm^3 de lessive de soude (hydroxyde de sodium concentré).
Rincer abondamment à l'eau du robinet.

Tableau 30.I Mesure de l'intensité respiratoire.

Définitions des symboles utilisés	Calculs
V : volume du dessiccateur exprimé en litres	Au début de l'expérience, on a : $P - P_0 = (N_{O_2} + N_{N_2}) RT/(V - v)$
v : volume de la solution d'hydroxyde de sodium placée dans le dessiccateur, v = 0,2 litre	En fin d'expérience on a, en négligeant la variation de volume due à la dénivellation dans le tube manométrique : $P_1 - P_0 = (N'_{O_2} + N_{N_2}) RT/(V - v)$
H : dénivellation en cm	La pression P_1, en fin d'expérience est : $P_1 = P - (H/1030)$
P : pression atmosphérique, exprimée en atmosphère	Donc : $P - P_1 = (H/1030) = (N_{O_2} - N'_{O_2}) RT/(V - v)$
P_1 : pression dans le dessiccateur en fin d'expérience, exprimée en atmosphère	Le nombre n_{O_2} de moles de dioxygène consommées est : $n_{O_2} = N_{O_2} - N'_{O_2} = H(V - v)/1030RT$
P_0 : pression de vapeur d'eau saturante à la température de l'expérience, exprimée en atmosphère	Le volume d'oxygène consommé, mesuré dans les conditions normales de température et de pression est : Vol. $O_2 = n_{O_2} \times 22{,}4$
N_{O_2} : nombre de moles de dioxygène au début de l'expérience	L'intensité respiratoire (IR), exprimée en L de dioxygène consommé par heure et par kilogramme de masse corporelle, est : IR = Vol. $O_2 \times 2/m$
N'_{O_2} : nombre de moles de dioxygène en fin d'expérience	
$n_{O_2} = N_{O_2} - N'_{O_2}$: nombre de moles de dioxygène consommées durant l'expérience	
N_{N_2} : nombre de moles d'azote	
R : constante des gaz parfaits = 0,082 $atm.L.mol^{-1}.K^{-1}$	
T = (t + 273) : température en Kelvins	
t : température en degrés Celsius	
Vol. O_2 : volume de dioxygène consommé, en L, mesuré dans les conditions normales de température et de pression	
m : masse de l'animal, exprimée en kg	

Verser 200 cm^3 d'eau distillée plus 20 gouttes de solution de rouge de méthyle. Réaliser, en versant quelques gouttes de solution d'acide chlorhydrique 0,1 mol/L, une légère acidification (teinte rose de l'indicateur).
Introduire le rat de l'expérience précédente dans le dessiccateur, robinets A et B ouverts. Opérer comme dans la première expérience, en prenant les mêmes précautions. Noter la dénivellation h après 30 minutes d'expérience *(tab. 30.II)*.

Tableau 30.II Mesure du quotient respiratoire.

Définitions des symboles utilisés	Calculs
P_2 : pression dans le dessiccateur en fin d'expérience, exprimée en atmosphère	On a en fin d'expérience précédente : $P_1 - P_0 = (N'_{O_2} + N_{N_2}) RT/(V - v)$
N_{CO_2} : nombre de moles de dioxygène en fin d'expérience	A la fin de la deuxième expérience on a, en négligeant la variation de volume : $P_2 - P_0 = (N'_{O_2} + N_{N_2} + N_{CO_2}) RT/(V - v)$
	La pression P_2, en fin d'expérience est : $P_2 = P - (h/1030)$
	Donc : $P_2 - P_1 = N_{CO_2}RT/(V - v) = (H - h)/1030$
	Donc : $N_{CO_2} = (H - h)(V - v)/1030RT$
	Le quotient respiratoire est égal à : $QR = n_{CO_2}/n_{O_2}$
	Soit : $QR = (H - h)/H$



7. Enregistrement des contractions de l'intestin isolé de lapin

Principe

Il est possible de maintenir certains organes en survie, *in vitro*, si l'on respecte certaines conditions :

- l'organe doit être placé dans l'eau, ce qui évite sa dessiccation et permet les échanges cellulaires ;
- il est nécessaire de maintenir le liquide d'irrigation à température constante si l'organe provient d'un organisme homéotherme, 37 à 38 °C pour un mammifère ;
- les cellules ont besoin d'oxygène, l'oxygénation est assurée par l'oxygène dissous dans le liquide de perfusion ou d'immersion ;
- les cellules des organes de mammifères ou d'oiseaux doivent être approvisionnées en substrat énergétique, c'est généralement le glucose qui joue ce rôle ;
- le pH du milieu de survie doit être maintenu exact et constant : 7,4 pour un mammifère ;
- la composition ionique du milieu doit remplir deux conditions :
  - sa pression osmotique doit correspondre à celle du milieu intérieur de l'animal étudié ;
  - elle doit respecter celle du milieu intérieur.

Un fragment d'intestin grêle de lapin placé dans du liquide de Tyrode, à 37 °C, se contracte rythmiquement.

On peut observer trois types de mouvements.

- La segmentation rythmique est due aux contractions de fibres circulaires *(fig. 30.16A)*. Ces contractions peuvent se produire jusqu'à plus de 20 fois par minute, ce qui assure un très efficace brassage du chyme intestinal.
- Le mouvement péristaltique met en jeu une série de réflexes locaux qui provoquent la contraction des fibres circulaires en arrière du point d'excitation, tandis que ces fibres se relâchent en avant de ce point *(fig. 30.16B)*. Le mouvement péristaltique assure *in vivo* la progression du chyme dans l'intestin.
- Le mouvement pendulaire est la conséquence des contractions rythmiques des fibres musculaires longitudinales, tantôt d'un côté de l'intestin, tantôt de l'autre *(fig. 30.16C)*. Ce mouvement de pendule de l'anse intestinale assure la progression du chyme.

Cette expérience a pour but d'enregistrer les mouvements pendulaires spontanés d'un segment d'intestin grêle de lapin et d'étudier l'action de substances pharmacodynamiques telles que l'adrénaline, l'acétylcholine et l'atropine.

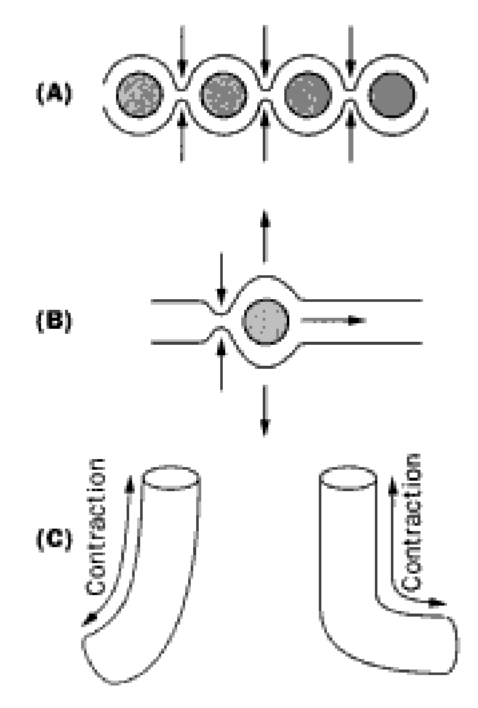


Figure 30.16. Les mouvements spontanés de l'intestin grêle.
(A) La segmentation rythmique.
(B) Le mouvement péristaltique.
(C) Le mouvement pendulaire.

Sécurité

Cette expérience ne présente aucun danger.

Matière d'œuvre

Matériel biologique

Un lapin.

Réactifs

– Liquide de Tyrode :
  – NaCl 8 g
  – KCl 0,20 g
  – $CaCl_2$ anhydre 0,20 g
  – $MgCl_2$ 0,10 g
  – $NaHCO_3$ 1 g
  – HNa_2PO_4 0,05 g
  – glucose 1 g
  – eau distillée 1 litre.

– Solution d'adrénaline à 20 mg/L*.
– Solution d'acétylcholine à 20 mg/L*.
– Solution d'atropine à 20 mg/L*.

* Les concentrations de ces solutions peuvent être modifiées en fonction de la sensibilité du fragment d'intestin utilisé.

Matériel

– Un montage pour organe isolé *(fig. 30.17)*.
– Un enregistreur-physiologie avec capteur de déplacement ou un cylindre enfumé.
– Un bulleur d'aquarium.
– Une pipette automatique Pipetman Gilson 0-50 µL.

Figure 30.17. Schéma du montage pour organe isolé.

Mode opératoire

En vertu de l'arrêté du 19/04/88 complétant le décret du 19/10/87 réglementant l'expérimentation sur les vertébrés, cette expérience n'est autorisée que dans le cadre de l'enseignement supérieur. L'euthanasie du lapin et le prélèvement de l'intestin ne peuvent être réalisés que par une personne habilitée.

Assommer un lapin à jeun depuis 24 heures. Ouvrir la peau et la paroi abdominale. Sectionner des fragments d'intestin grêle de 2 à 3 cm de long. Les placer dans un becher contenant du liquide de Tyrode à 37 °C. Fixer le fragment dans le montage, d'un côté au crochet aérateur, de l'autre au fil relié au capteur de déplacement ou au levier appliqué au cylindre. Attendre quelques minutes que les contractions soient régulières et enregistrer *(fig. 30.18A)*.

Déterminer la fréquence des contractions.

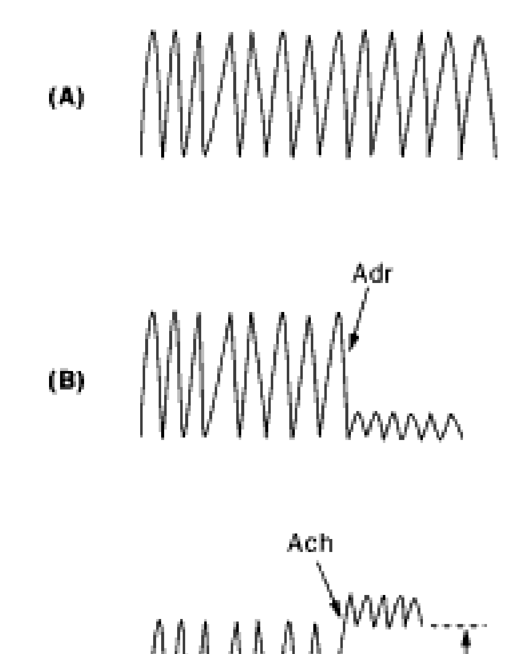


Figure 30.18. Enregistrements des mouvements d'un fragment d'intestin grêle.
(A) Mouvements normaux.
(B) Effet de l'adrénaline.
(C) Effet de l'acétylcholine.

■ ***Effet de l'adrénaline***

L'adrénaline inhibe les mouvements de l'intestin en diminuant leur amplitude. Le système orthosympathique, adrénergique, est inhibiteur des mouvements intestinaux.

Ajouter 20 µL de solution d'adrénaline à 20 mg/L. Observer la diminution d'amplitude *(fig. 30.18B)*.

Purger l'appareil et recommencer avec 30, 40 µL. Noter que, à partir d'une certaine dose, on obtient un effet de saturation lorsque tous les récepteurs à adrénaline sont occupés.

■ ***Effet de l'acétylcholine***

L'acétylcholine augmente le tonus de la musculature lisse intestinale. Cette augmentation du tonus s'accompagne d'une diminution de l'amplitude. La dénivellation h est due au raccourcissement du fragment d'intestin *(fig. 30.18C)*.

Ajouter 20 µL d'une solution d'acétylcholine à 20 mg/L. Observer une élévation h de la ligne de base. Purger l'appareil et recommencer avec 30, 40 µL. Noter que, à partir d'une certaine dose, on obtient un effet de saturation lorsque tous les récepteurs à acétylcholine sont occupés.

■ ***Effet de l'atropine et de l'acétylcholine***

Ajouter 20 µL de la solution d'acétylcholine puis, sans rincer, 20 µL d'une solution d'atropine à 20 mg/L. Observer que l'atropine inhibe l'effet de l'acétylcholine. L'inhibition est compétitive.



Les Algues

Sommaire

1. Le Fucus vésiculeux, algue marine côtière

Mots clés

Algue, littoral, thalle, réceptacle, conceptacle.

Principe

Commune sur le littoral de la Manche ou de l'océan Atlantique, le Fucus fait partie des goémons ou varechs (« association » d'algues brunes ou Phéophycées, etc.) qui, accrochés aux rochers de la zone de balancement des marées, meublent, à marée basse, les côtes bretonnes, par exemple.
Il préfère les emplacements où la mer n'est pas trop agitée et s'installe très souvent jusqu'à la limite supérieure des marées.

Sécurité

Pour sa récolte en bordure de mer, consulter également la fiche 31.5 « Confection d'un herbier d'algues marines », p. 368.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***
Echantillons de Fucus vésiculeux *(Fucus vesiculosus)* de préférence, sinon d'autres Fucus peuvent convenir (Fucus à bord denté ou *Fucus serratus*, *Fucus platycarpus*, etc.), à se procurer éventuellement chez un poissonnier.

■ ***Réactifs***
- Eau glycérinée.
- Eau de mer ou solution saline à 35 %.

■ ***Matériel***
- Microscope.
- Loupe binoculaire.
- Lames et lamelles.
- Verres de montre.
- Pinces fines.
- Lame de rasoir.
- Aiguille lancéolée.
- Moelle de Sureau.

Mode opératoire

Examiner sommairement à l'œil nu tout d'abord le thalle *(fig. 31.1)*, c'est-à-dire l'appareil végétatif d'un Fucus entier avec :
- une lame brunâtre aplatie dotée de flotteurs en forme de vésicules (d'où son appellation), agrémentée d'une pseudo-nervure médiane, ramifiée par bifurcations successives (on parle d'une ramification par dichotomie) plus ou moins régulières ;

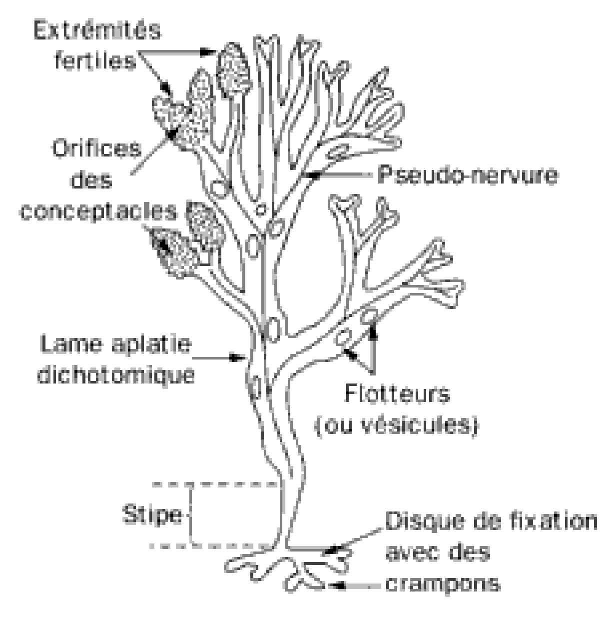
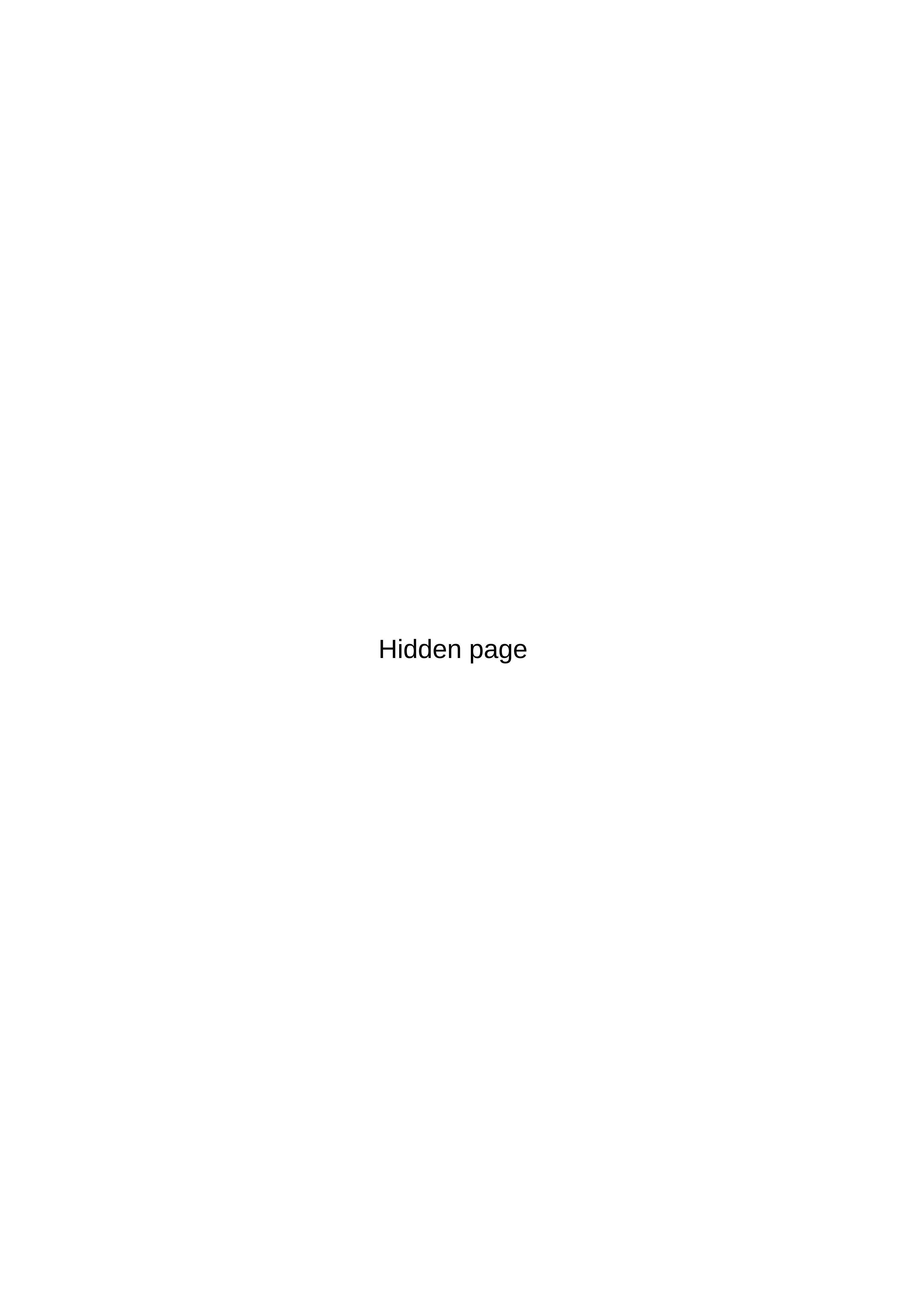


Figure 31.1. Le Fucus vésiculeux.



– la région médullaire qui intéresse le centre du thalle. Elle est représentée par des cellules allongées longitudinalement à parois épaisses, partiellement disjointes, ménageant entre elles des lacunes remplies de mucilage, sorte de gelée dérivée des composés glucidiques pariétaux. Elles interviennent dans le soutien du thalle et peut-être dans la conduction de l'eau, au sein du végétal.

• La coupe transversale d'une extrémité sexuelle ou réceptacle permet de voir de nombreuses cavités sphériques ou conceptacles qui s'ouvrent à l'extérieur par une ouverture ou ostiole.

Chez le Fucus vésiculeux, les conceptacles mâles et femelles sont portés par des individus différents : il s'agit d'une algue dioïque (contrairement à d'autres espèces de Fucus).

Les conceptacles de teinte orangée contiennent de nombreux organes sexuels mâles ou spermatocystes fixés latéralement sur des filaments ramifiés fertiles *(fig. 31.2)*. Chaque spermatocyste contient à maturité 64 spermatozoïdes biflagellés munis d'un stigma orangé (plaste original riche en caroténoïdes). Les nombreux organes sexuels expliquent la couleur orangée de la gelée qui sort par les ostioles des conceptacles mâles permettant d'identifier le sexe de l'individu considéré (ceci au moment de la maturité des organes sexuels, en mai-juin).

Les conceptacles de teinte brun vert contiennent des organes femelles ou oogones attachés directement à la paroi du conceptacle par une cellule-pédicelle et protégés au sein d'un feutrage de filaments simples stériles *(fig. 31.3)*.

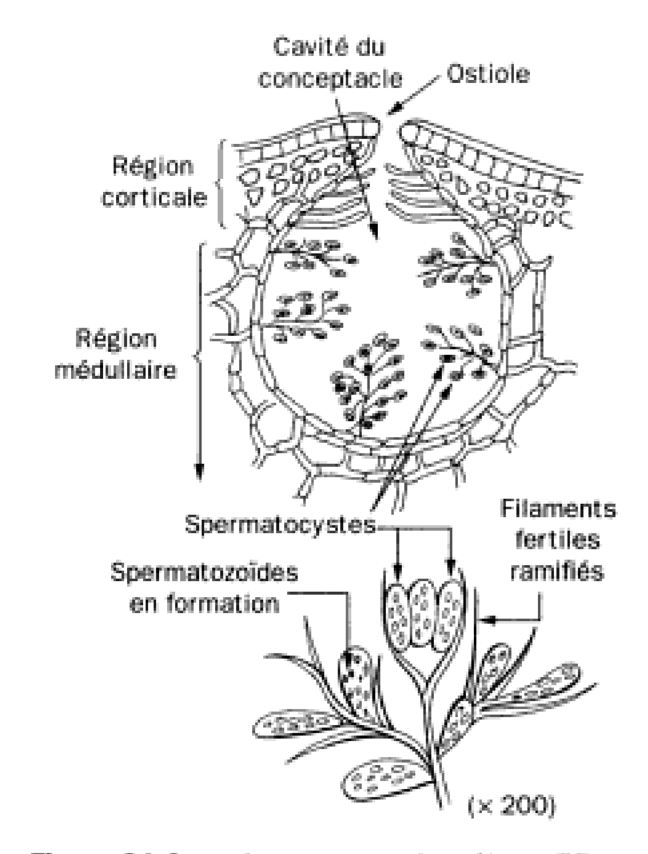


Figure 31.2. Le conceptacle mâle (× 75).

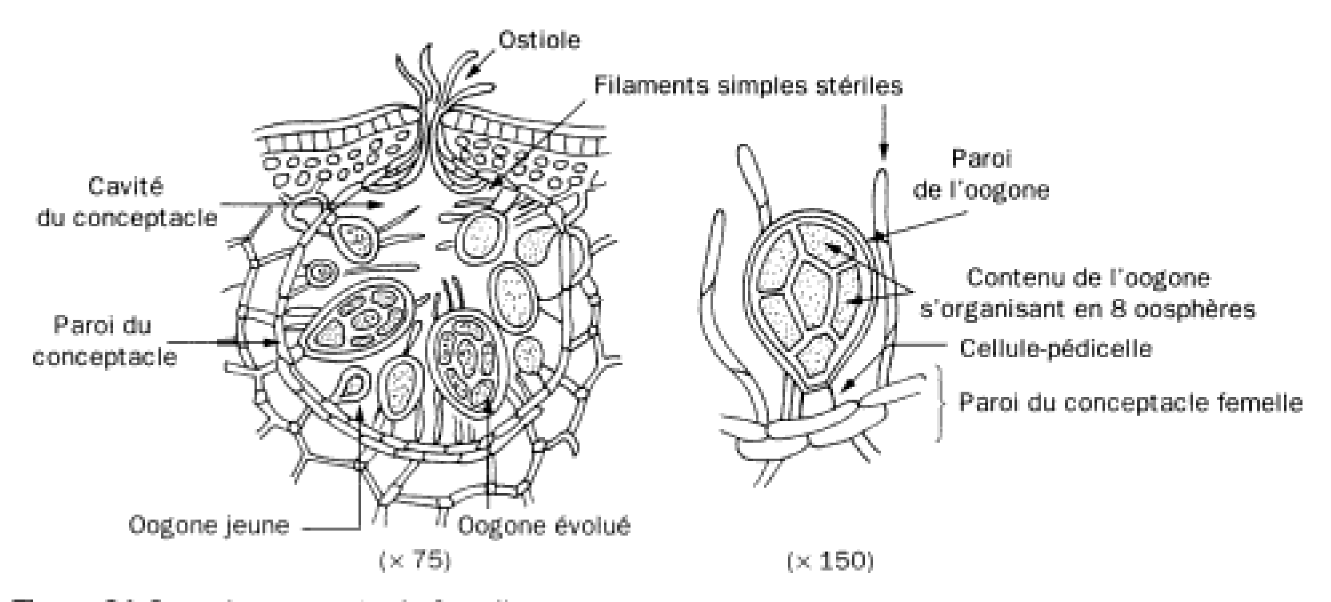


Figure 31.3. Le conceptacle femelle.

2. La Spirogyre, algue verte d'eau douce

Mots clés

Algue, gamétocyste, conjugaison, zygospore.

Principe

Très souvent marines, les algues peuplent également les eaux douces ; en particulier, la Spirogyre, fréquente à la belle saison, est formée de filaments gluants et verts.
Cette algue verte flottante, absorbant comme toutes les algues vertes les radiations orangées du spectre solaire, est un bon exemple d'appareil végétatif simple ou thalle.

Sécurité

Cette manipulation ne présente aucun danger.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

Des échantillons de Spirogyre ou autres algues filamenteuses d'eau douce comme Zygnema (aux deux chloroplastes étoilés dans chacune de ses cellules) ou Mougeotia (au large et unique chloroplaste aplati par cellule), etc.

■ ***Réactifs***

Lugol, solution iodo-iodurée :
- iode 4 g
- iodure de potassium 8 g
- eau distillée qsp 1 000 cm^3

■ ***Matériel***

- Microscope.
- Lames et lamelles.
- Aiguille lancéolée.
- Pinces fines.
- Verres de montre.
- Filet à mailles fines.

Mode opératoire

Au printemps de préférence, en utilisant un filet à mailles fines glissé près de la surface de l'eau, recueillir des algues filamenteuses capables d'être conservées au laboratoire dans un aquarium bien éclairé, à la température ambiante. En disposer quelques exemplaires dans des verres de montre pour faciliter leur tri.
En effet, il convient de trier les filaments, disposés au préalable sur une lame recouverte d'une goutte d'eau. Prélever ensuite, à la pince fine en s'aidant d'une aiguille lancéolée, un échantillon et l'identifier après l'avoir installé entre lame et lamelle dans une goutte d'eau. La Spirogyre se reconnaît à ses filaments simples dont toutes les cellules sont identiques et possèdent des chloroplastes de grande taille en forme de rubans spiralés.
Dessiner.
Réaliser un second montage de l'échantillon de Spirogyre dans une goutte de solution iodo-iodurée.

Observer plus de détails cytologiques à l'aide du fort grossissement du microscope. Dessiner.
En hiver, on peut éventuellement récolter des individus en conjugaison, c'est-à-dire en cours de reproduction sexuée. Recueillir alors ces filaments peu colorés, en monter quelques-uns entre lame et lamelle dans un peu d'eau. Les examiner au fort grossissement du microscope. Faire un croquis annoté.

Résultats, observations et interprétation

Les filaments sont simples, c'est-à-dire non ramifiés : ce sont des associations linéaires homogènes de cellules chlorophylliennes organisées sur le même modèle *(fig. 31.4)*.
La cellule-type comporte au moins un volumineux chloroplaste en ruban spiralé (ou plusieurs selon les espèces de Spirogyre), sorte d'hélice contenue dans le cytoplasme périphérique. En effet, une grande vacuole occupe le centre de la cellule, d'ailleurs compartimentée par des travées cytoplasmiques rayonnantes qui maintiennent le noyau, de petite taille et peu visible, en position médiane *(fig. 31.5)*.
Le ou les chloroplastes portent à intervalles réguliers des granules brillants ou pyrénoïdes de nature protéique autour desquels s'accumulent les granules d'amidon photosynthétisés *(fig. 31.6)*.
La paroi squelettique cellulosique est doublée extérieurement d'une fine couche de mucilage qui confère à l'algue son toucher gluant caractéristique.
Avec le réactif iodo-ioduré, les cellules des filaments sont fixées et colorées ; les granules d'amidon sont colorés en bleu et le noyau coloré en brun devient visible.
Pendant la belle saison (lumière et température favorables), chaque cellule d'un filament de Spirogyre peut se diviser transversalement si bien que le filament s'allonge sans se ramifier. Par la suite, le long filament obtenu peut se briser sans inconvénient et ses fragments s'allongent à leur tour, étant ainsi les artisans d'une multiplication végétative efficace, d'où l'abondance des algues filamenteuses dans certaines pièces d'eau en été.
En automne, des filaments sexuellement complémentaires se disposent côte à côte et leurs cellules en vis-à-vis émettent chacune une protubérance en direction de l'autre. Les deux protubérances se rejoignent en un tube de conjugaison : le contenu des cellules d'un des deux filaments, présumé « mâle », se déverse dans les cellules de l'autre filament considéré comme « femelle ».

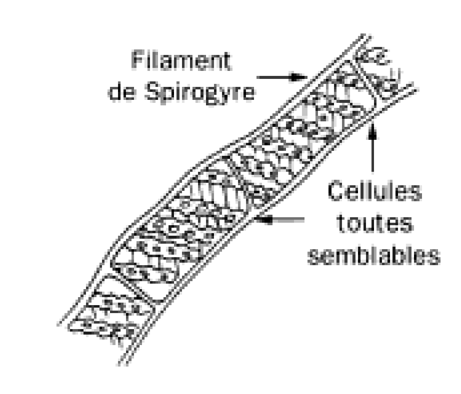


Figure 31.4. Fragment du thalle filamenteux de Spirogyre (× 200).

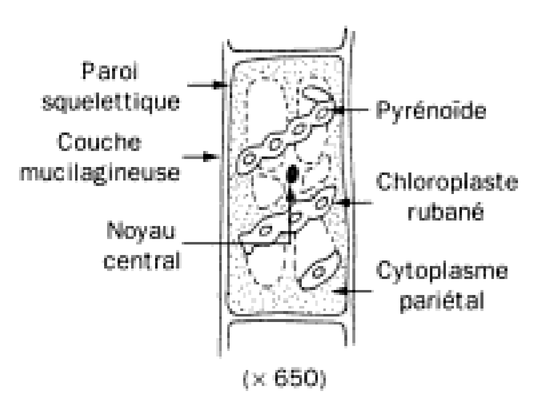


Figure 31.5. Une cellule « standard » de la Spirogyre (× 750).

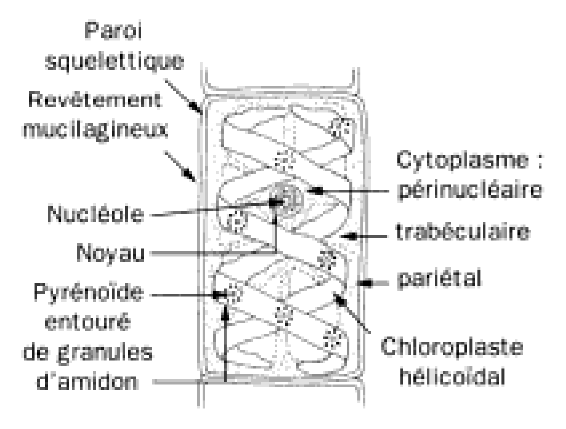


Figure 31.6. Cytologie de la Spirogyre (× 900).

Le filament mâle se vide dans le filament femelle. En principe, chacune des cellules de ce dernier est le siège d'une telle fécondation ; son contenu s'entourant d'une paroi opaque, épaisse, devient une zygospore qui passe en vie ralentie.
En hiver, les parois des filaments ayant ainsi pratiqué la conjugaison scalariforme (analogie entre la disposition des filaments conjugués et les montants d'une échelle !) ne tardent pas à disparaître *(fig. 31.7)* et les zygospores assurent alors le passage de la mauvaise saison pendant laquelle la Spirogyre n'existe donc plus à l'état végétatif.
Au retour de conditions favorables, au printemps en général, la zygospore déchire sa paroi, divise son contenu cellulaire et germe en un nouveau filament chlorophyllien de Spirogyre.

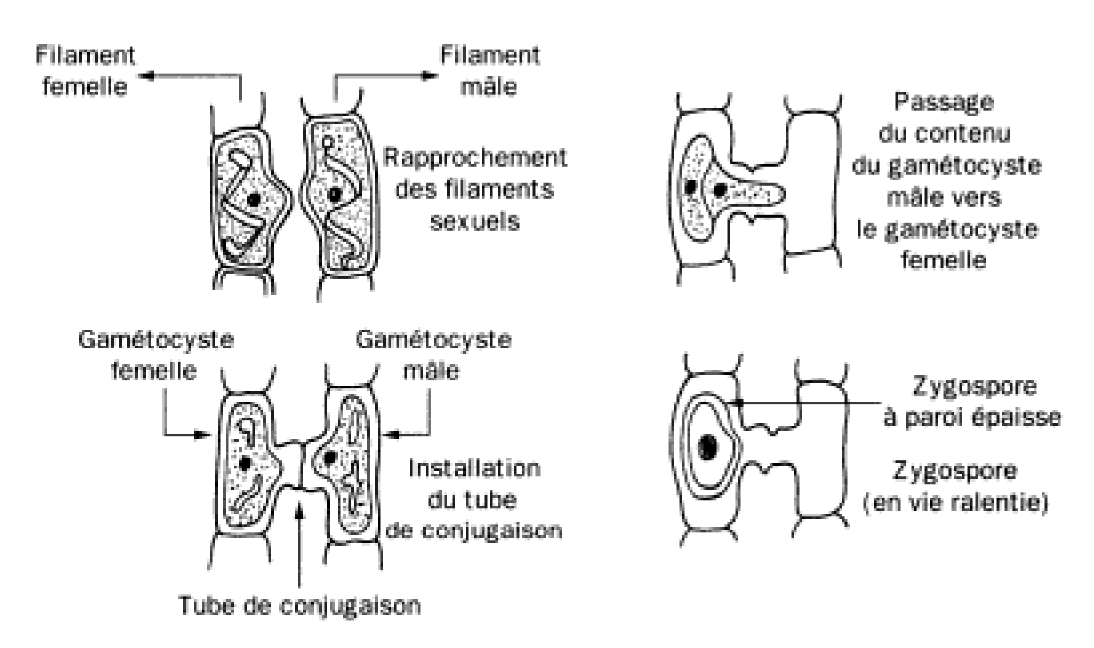


Figure 31.7. Conjugaison scalariforme.

Conclusion

La Spirogyre, avec sa multiplication végétative active pendant la belle saison et sa reproduction sexuée (la conjugaison) en automne qui lui fait passer l'hiver sous la forme d'une zygospore à vie ralentie, illustre l'adaptation biologique des végétaux d'eau douce aux variations saisonnières de leur environnement.

Résultats, observations et interprétation

Dans son milieu, l'Euglène change sans arrêt d'aspect, se raccourcit, se déforme, s'étire mais ne fabrique pas de pseudopodes. Sa forme est allongée et étroite. Le corps est limité par une mince cuticule élastique *(fig. 31.8)*.

A l'extrémité dite antérieure, l'Euglène présente une invagination en ampoule, le réservoir, qui est en relation avec le milieu extérieur par un étroit goulot par où sort le grand flagelle inséré au fond du réservoir. Ce dernier est lui aussi recouvert d'une cuticule, sauf du côté ventral où une vacuole pulsatile à rôle osmorégulateur y déverse son contenu.

Accolé à la paroi dorsale du réservoir, se localise un corpuscule rouge, le stigma (organite original qui accumule un pigment caroténoïde rouge orangé).

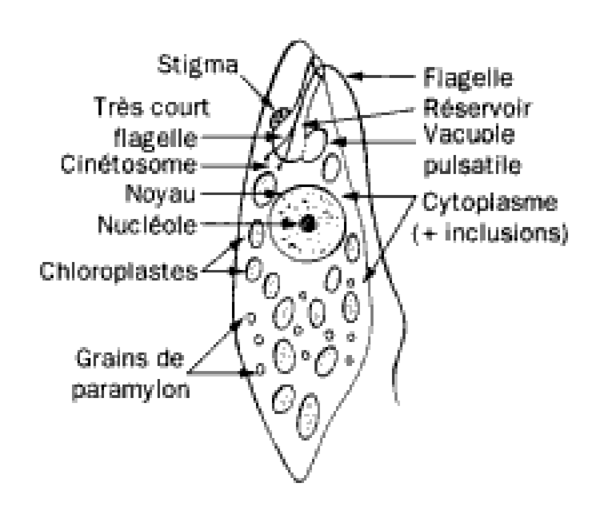


Figure 31.8. Une Euglène chlorophyllienne (× 450).

Tout le cytoplasme apparaît coloré en vert, accompagné de corpuscules très réfringents de paramylon, en forme de bâtonnets.

Au fort grossissement, le centre de l'euglène est occupé par un noyau ovalaire, porteur d'un nucléole.

La coloration verte est due à des plastes, souvent ovoïdes, porteurs de chlorophylle.

A l'avant, un flagelle par ses battements sert d'organite de locomotion. A ce propos, l'euglène dispose de deux modes de locomotion :

– la nage à l'aide du flagelle, orienté en tractelle, lorsqu'elle est en pleine eau ;
– la reptation au contact d'un support solide ; ses contractions dues au cytosquelette rappellent celles des fibres musculaires des Métazoaires supérieurs *(fig. 31.9)*.

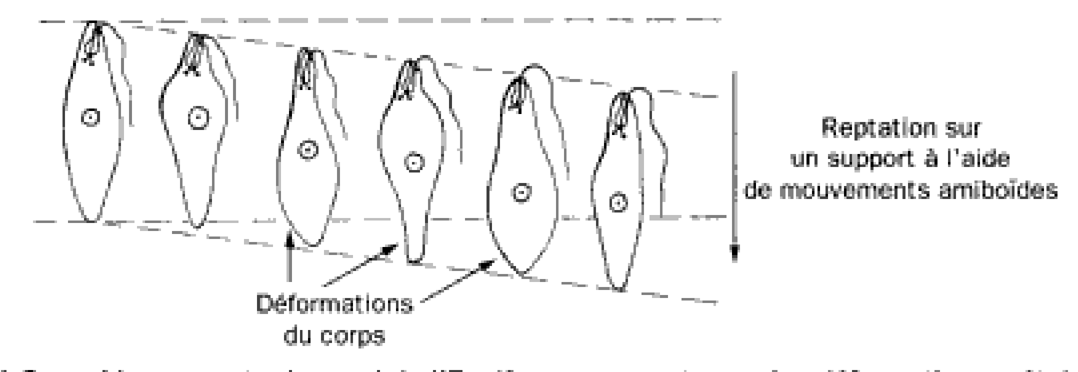
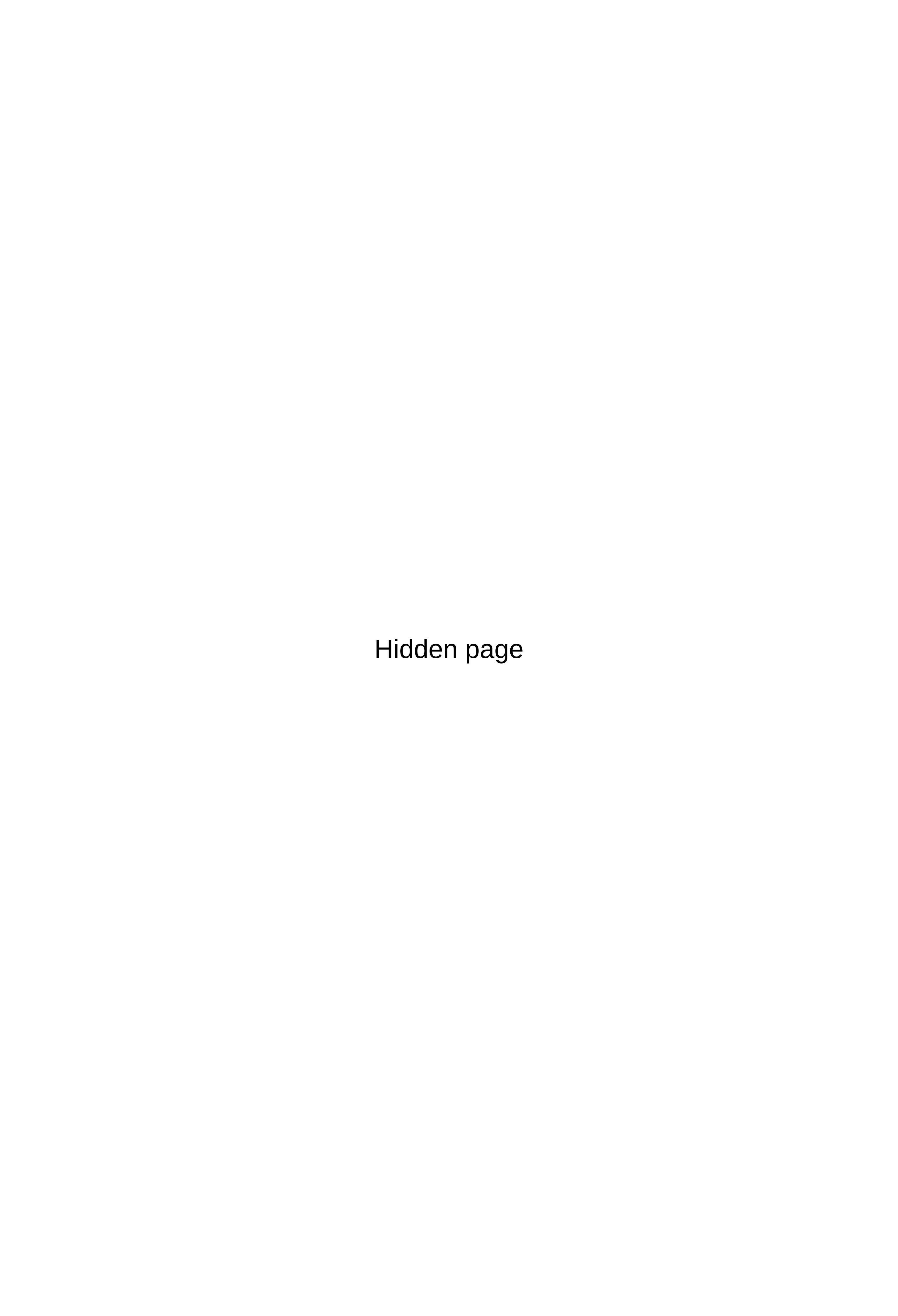


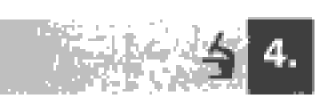
Figure 31.9. Mouvements de recul de l'Euglène en rapport avec les déformations métaboliques.

Le flagelle vient s'attacher sur le bord d'une sorte d'entonnoir, dépression de la membrane plasmique, qui se loge entre le stigma et la vacuole pulsatile.

Remarque : il y a en général deux flagelles très inégaux ; l'un d'eux, très court, est entièrement contenu dans l'entonnoir et se fusionne à la base de l'autre qui sort par le goulot de l'entonnoir.

La vacuole pulsatile, appliquée contre l'entonnoir, est capable alternativement de diastole et de systole selon qu'elle se remplit de liquide ou l'expulse dans l'entonnoir qui l'évacue, à son tour, à l'extérieur. Cette vacuole assure un courant d'eau continu à travers


Hidden page



4. Le Pleurocoque, algue verte terrestre

Mots clés

Algue, thalle.

Principe

Certaines algues peu nombreuses peuvent vivre en milieu aérien, dans des endroits assez humides cependant. C'est ainsi que, dans les sous-bois forestiers par exemple, les troncs d'arbres (à l'écorce rugueuse principalement) peuvent être recouverts d'un enduit poussiéreux verdâtre, préférentiellement sur leur face la plus exposée aux intempéries (au nord en général).
Cette « poussière » se détache facilement au moindre frottement (gare aux vêtements ainsi tachés !) : il s'agit d'algues microscopiques qu'il convient d'étudier.

Sécurité

Cette manipulation ne présente aucun danger.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***
Echantillon d'écorce d'arbre forestier, recouverte d'une « poussière » verte.

■ ***Matériel***
– Microscope.
– Scalpel.
– Aiguille lancéolée.
– Lames et lamelles.
– Compte-gouttes.
– Pinces fines.

Mode opératoire

Sur un fragment d'écorce, prélever à l'aide de la pointe du scalpel ou de l'aiguille lancéolée un peu de la « poussière » verte ; sur une lame portant une goutte d'eau, y délayer l'échantillon.
Recouvrir d'une lamelle et observer au fort grossissement ; apparaîtront dans le champ microscopique des cellules vertes car chlorophylliennes, isolées ou groupées par deux ou quatre.

Résultats, observations et interprétation

Le Pleurocoque est une Chlorophycée, c'est-à-dire une algue verte, unicellulaire.
Chaque individu comporte, sous une paroi squelettique, un cytoplasme occupé pour l'essentiel par un volumineux chloroplaste unique (ou chromatophore) en forme de cupule enserrant et cachant les autres organites cellulaires, le noyau en particulier *(fig. 31.10)*.
En atmosphère humide, sur un support éclairé, la croissance est rapide et une ou deux divisions binaires expliquent l'observation fréquente des algues par 2 ou 4, association traduisant un thalle colonial temporaire, précédant la séparation des cellules-filles *(fig. 31.11)*.

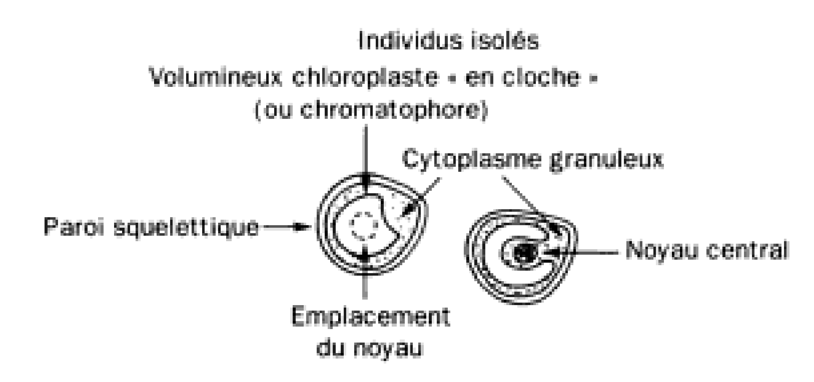


Figure 31.10. Organisation du Pleurocoque (× 950).

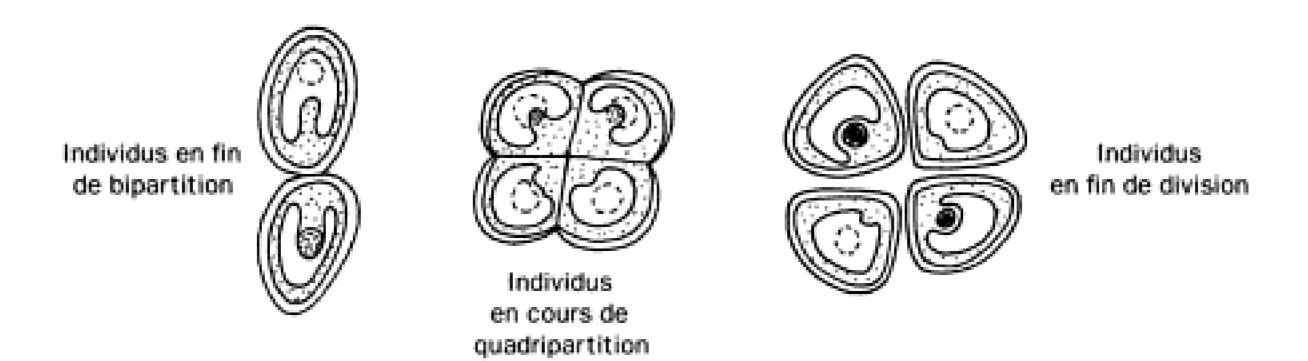


Figure 31.11. Individus en division (× 950).

La facilité de ce mode de multiplication végétative simple du thalle fait mieux comprendre le peuplement envahissant des Pleurocoques.
Soumise cependant aux aléas du climat, cette algue terrestre traduit une bonne adaptation aux pertes d'eau ; en conditions devenues défavorables, elle se déshydrate et passe en vie ralentie… attendant les prochaines pluies !

Conclusion

Le Pleurocoque, adapté au milieu terrestre, représente une algue unicellulaire à tendance coloniale et peut servir d'illustration au passage hypothétique des végétaux à l'état pluricellulaire.

5. Confection d'un herbier d'algues marines

Mots clés

Algue, thalle, zone intertidale, pigments.

Principe

Si on a l'occasion de faire un séjour au bord de la mer, lorsque l'on se promène le long d'une côte rocheuse de la Manche ou de l'Atlantique, on peut récolter des algues à marée basse ; leur grande diversité d'aspect et de couleur vaut la peine de les conserver sous forme d'herbier.
En fonction de leurs pigments photosynthétiques, les algues marines se répartissent en effet selon une zonation littorale caractéristique avec les algues vertes (Chlorophycées), les plus proches de la surface, les algues brunes (Phéophycées), un peu plus basses, et les algues rouges (Rhodophycées) jusque dans des fonds de quelques dizaines de mètres.
Dans l'eau, les diverses radiations lumineuses sont absorbées de façon inégale : les radiations rouges disparaissent les premières, les algues vertes qui les utilisent ne peuvent alors plus vivre. Les algues brunes et les algues rouges, capables d'absorber d'autres radiations, se développent encore au-delà.
Dans le cas le plus fréquent, on observe essentiellement des algues brunes (Phéophycées) sur les rochers découverts par la mer. Celles-ci sont réparties en ceintures ; chacune forme une zone colorée, plus ou moins large et discontinue, regroupant des algues diverses mais typiques d'un niveau marin donné.
Beaucoup possèdent des « tissus » gélatineux qui font qu'elles ne se dessèchent pas à marée basse lorsqu'elles sont exposées au soleil. Leur surface glissante empêche qu'elles ne s'emmêlent et ne se déchirent sous l'action des vagues.
On différencie alors :

- la zone pratiquement jamais immergée, mais soumise aux embruns et caractérisée par une succession de lichens *(tab. 31.I)* ;
- la zone noire, peu étendue, des « goémons noirs », correspondant à la limite supérieure des algues marines ;
- la zone brun noirâtre des « goémons jaunes », représentée par les différents Fucus ;
- la zone des Himanthalia dont les thalles, en forme de longues lanières d'un jaune brillant, opposent une barrière aux vagues ; cette zone n'est découverte qu'aux basses mers de vives eaux ;
- la zone des Laminaires ne se découvre véritablement qu'aux grandes marées, mais il est possible de recueillir des « épaves », c'est-à-dire des spécimens arrachés et transportés plus haut à la faveur des tempêtes.

Sécurité

Le promeneur doit connaître l'amplitude de la marée qui détermine le type d'échantillons à récolter car chaque espèce de la zone littorale a ses propres exigences vis-à-vis du temps d'émersion et de la profondeur.
Le document essentiel à posséder est *l'annuaire officiel des marées* et il faut consulter le bulletin météorologique régional du quotidien local. En bord de mer, il indique la force des vents, les avis de tempête et l'horaire des pleines mers et basses mers avec leur coefficient. Actuellement, les horaires sont donnés en heure légale. Le coefficient est donné deux fois : pour le matin et le soir.

On signalera sa fréquence par R (rare), C (commune), CC (très commune), ainsi que l'habitat : nature de la roche (granitique, calcaire ou schisteuse, etc.), niveau sableux ou vaseux, etc.
On y ajoute la date de l'excursion ; si l'échantillon est rejeté en tant qu'épave, le mentionner également.

■ ***Au laboratoire (ou à la maison)***

Ne jamais préparer les algues marines à l'eau douce qui détruit les cellules et empêche leur étude ultérieure ; la préparation à l'eau de mer ne nuit pas à leur conservation.
La première manipulation consiste à laver la récolte à l'eau de mer pour débarrasser les échantillons du sable et de la vase qui les recouvrent.
Poser dans la cuvette un galet plat à chaque coin puis, successivement, la plaque de verre, le papier fort (genre Bristol) et recouvrir l'ensemble de 1 à 2 centimètres d'eau de mer.
Choisir un fragment pas trop fourni d'une algue à conserver ; sous l'eau, étaler ensuite l'algue sur la feuille de papier, le plus artistiquement possible.
Redresser lentement la plaque de verre et le papier pour ne pas déplacer l'échantillon. Laisser égoutter en inclinant légèrement l'ensemble.
Puis, poser la feuille de papier portant l'algue sur une planche inclinée pour que l'eau s'égoutte complètement.
Procéder ensuite à la mise en presse et au séchage à l'aide de « cahiers » (plusieurs feuilles empilées) de papier absorbant (type vieux journaux secs ou papier Sopalin ou similaire). Disposer sur l'algue un chiffon protecteur, blanc, fin et usagé, ou bien un papier glacé. Placer une feuille portant une algue sur un cahier absorbant. Recommencer la manipulation pour tous les échantillons de l'herbier. Chaque échantillon est ainsi séparé de ses voisins par des feuilles absorbantes.
Lorsque tous les échantillons sont empilés, mettre une planche surmontée d'un poids de 10 à 15 kg, faisant office de presse.
Changer ces journaux une première fois au bout de 1 heure, puis de 3 heures, puis de 12 heures, enfin une fois par jour jusqu'à ce que l'échantillon d'algue soit sec.
Le mucilage qui recouvre l'algue, en séchant, permet la fixation au papier.
A signaler que certaines algues brunes épaisses et mucilagineuses, comme les Fucus et les Laminaires, sont tout particulièrement difficiles à sécher en herbier. Le mucilage, très abondant, peut en effet gêner leur conservation ; on peut faire disparaître cet inconvénient en plongeant les échantillons dans un bain composé d'eau et de 20 g d'alun calciné.
Remarque : on peut utiliser le début de la manipulation mais faire sécher l'algue à même la plaque de verre, l'effet artistique est renforcé et l'observation pour une classe en est facilitée.

Cette opération de séchage effectuée, disposer chaque algue préparée sur une feuille de papier bulle de format uniforme (souvent 20 × 30 centimètres) à laquelle il convient de fixer une étiquette placée à un angle de la feuille comportant le nom de l'algue, le lieu, le biotope et la date de la récolte.
Pour la détermination des échantillons, consulter des ouvrages simples ornés de dessins en couleur (par exemple, *Les Algues marines des côtes de France* par E. Wuitner, Lechevallier éd.).
Par la suite, il est possible de classer les divers feuillets par ordre systématique (algues vertes, brunes, rouges), par lieux de récolte (vasières, rochers, flaques d'eau de mer, etc.).

Résultats, observations et interprétation

Si possible, envisager l'excursion le matin après le calme de la nuit. Une mer agitée n'est pas propice à une bonne récolte.

Les meilleures marées précèdent les périodes de la nouvelle lune et de la pleine lune (en particulier, au moment des marées des équinoxes de printemps et d'automne).

Occupant fondamentalement la zone intertidale, c'est-à-dire l'espace marin situé entre les limites extrêmes des plus fortes marées annuelles, les algues du littoral marin sont abondantes et diverses *(tab. 31.I)*, essentiellement constituées par des algues brunes, auxquelles s'ajoutent des algues vertes et rouges.

Cette population algale montre un étagement qui reflète le rythme des marées et exprime la capacité de résistance des individus à la déshydratation consécutive à l'exondation.

A chaque basse mer, le tapis aux couleurs variées formé par les algues est en partie à sec et à découvert durant quelques heures ; il faut être sur place une heure et demie environ avant le retour du flux pour commencer une récolte fructueuse.

• A la limite de la zone supérieure, on observe sur presque tous les rochers une ceinture plus ou moins large d'algues brunes appartenant à l'ordre des Fucales.

Ce sont des algues fixées par une base en forme de disque ; leurs thalles sont découpés en lanières ; leurs organes de reproduction sexuée se localisent dans des zones plus ou moins renflées (ou réceptacles), formées de cavités (ou conceptacles) abritant les organes sexuels.

A maturité les gamètes sont libérés dans l'eau de mer dans laquelle se produit la fécondation ; les cellules-œufs (ou zygotes) obtenues germent ensuite chacune en un nouveau thalle.

Ainsi, trouve-t-on le *Pelvetia canaliculata* *(fig. 31.12)* qui fait partie des « goémons noirs ». Les thalles, de 5 à 15 cm de hauteur, aux lanières étroites, canaliculées (présentant une gouttière médiane bien visible), portent à leurs extrémités des organes sexuels jaune d'or. On a affaire à une algue monoïque, car les conceptacles contiennent à la fois des organes mâles et femelles. Cette algue ne connaît la mer qu'à marée haute et subit donc de longues périodes d'émersion.

A sec, elle se recroqueville et noircit pour reprendre aussitôt sa vigueur dès que la mer la baigne à nouveau.

Bien installé sur les côtes abritées, le *Pelvetia* diminue de taille jusqu'à disparaître complètement dans les endroits battus. Il y est remplacé par un lichen noir (g. *Lichina pygmaea*) dont les thalles forment de petites touffes qui évoquent une chevelure crépue.

• Le niveau des « goémons jaunes » s'étend en pente douce depuis le niveau des hautes mers de mortes eaux jusqu'à celui des basses mers de mortes eaux.

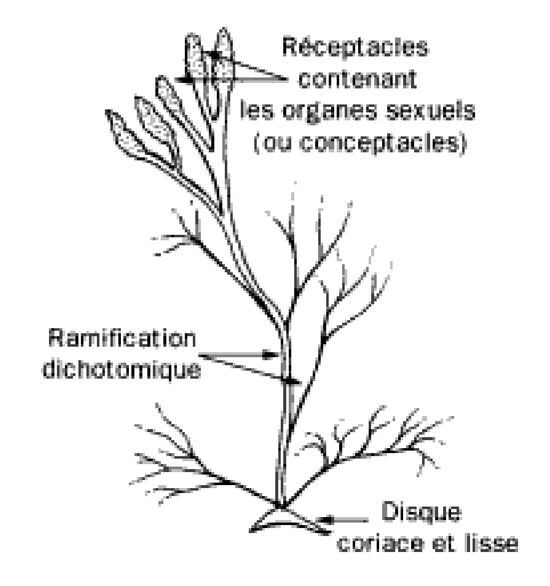


Figure 31.12. *Pelvetia canaliculata* (Phéophycées – Fucacées).
Thalle assez modeste, 5 à 15 cm de haut, plat, très dichotomique, adhérant au rocher par un disque coriace qui se prolonge par une touffe de frondes planes, canaliculées sur une de leurs faces. Les conceptacles sont réunis en réceptacles renflés au sommet de rameaux, de teinte jaune d'or tranchant sur le reste du végétal olivâtre. Deux oosphères par oogone. Algue hermaphrodite.
Habitat : à la zone supérieure des marées, sur tous les rochers du littoral de France, toute l'année.

Les algues sont si abondantes qu'elles masquent le relief. Les goémons jaunes ne sont pas partout les mêmes. Plusieurs se succèdent et s'étagent entre les rochers et le bas de l'eau, d'autres s'y substituent en passant d'une région abritée à une région battue par les flots.
Associé au *Pelvetia* de la zone supérieure, on trouve le *Fucus spiralis* ou *Fucus platycarpus (fig. 31.13)*, au thalle court et vivace (10 à 40 cm de hauteur et 1 à 3 cm de large) d'un beau vert olive. Il porte des renflements spongieux et gluants. Algue monoïque, ce Fucus occupe une ceinture peu épaisse.
Assez vite, le *Fucus spiralis* est remplacé par le *Fucus vesiculosus (fig. 31.14)* dont le thalle élargi montre une nervure médiane de chaque côté de laquelle sont espacées des vésicules ovales et brillantes. Sa forte densité de population explique les masses sombres cachant le soubassement des rochers de fixation. Sous les pas, on entend l'éclatement de ses vésicules aérifères.
Ce Fucus est vivace et installe sa reproduction sexuée pendant la deuxième année ; sa durée de vie est de 3 ans en moyenne.
Remarque : (voir 31.1).

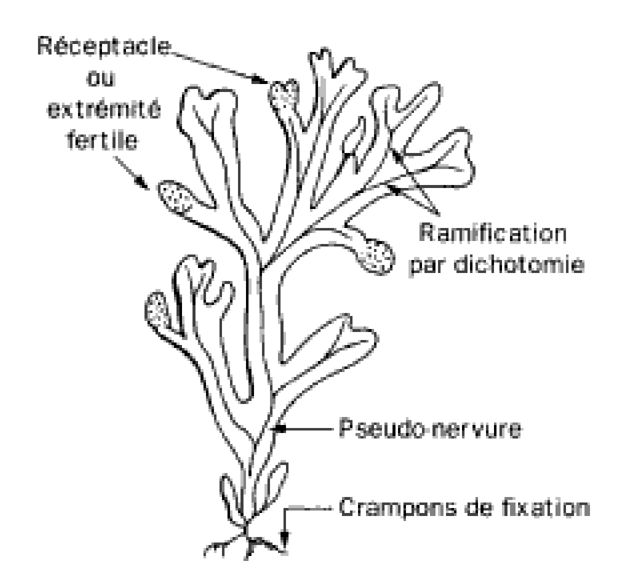


Figure 31.13. *Fucus spiralis* ou *Fucus platycarpus* (Phéophycées – Fucacées).
Thalle hermaphrodite de 50 cm de hauteur environ (de 1 à 3 cm de largeur), épais, d'un beau vert olive, sans vésicules aérifères spéciales. A l'extérieur des frondes s'observent les réceptacles (parties de la fronde où se concentrent les cryptes pilifères sexuées ou conceptacles) ovales et marginés, obtus brusquement comme tronqués et accolés deux à deux, plus larges que le thalle.
Habitat : à la limite supérieure des hautes mers au-dessus du *Fucus vesiculosus*. Très commun sur toutes les côtes de France.

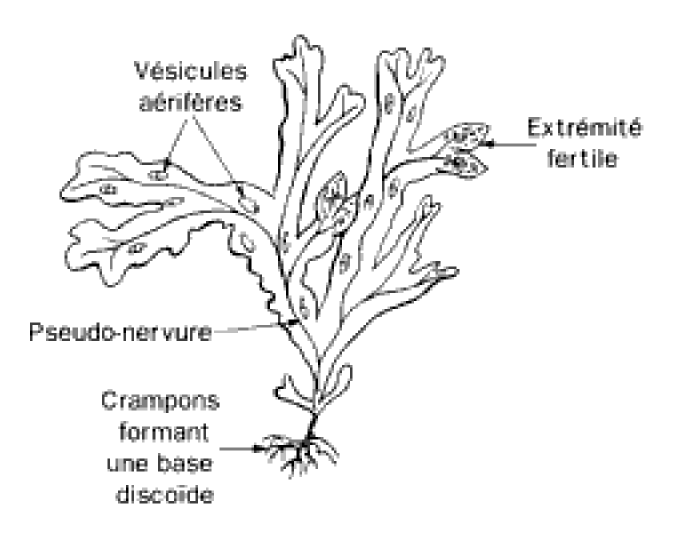
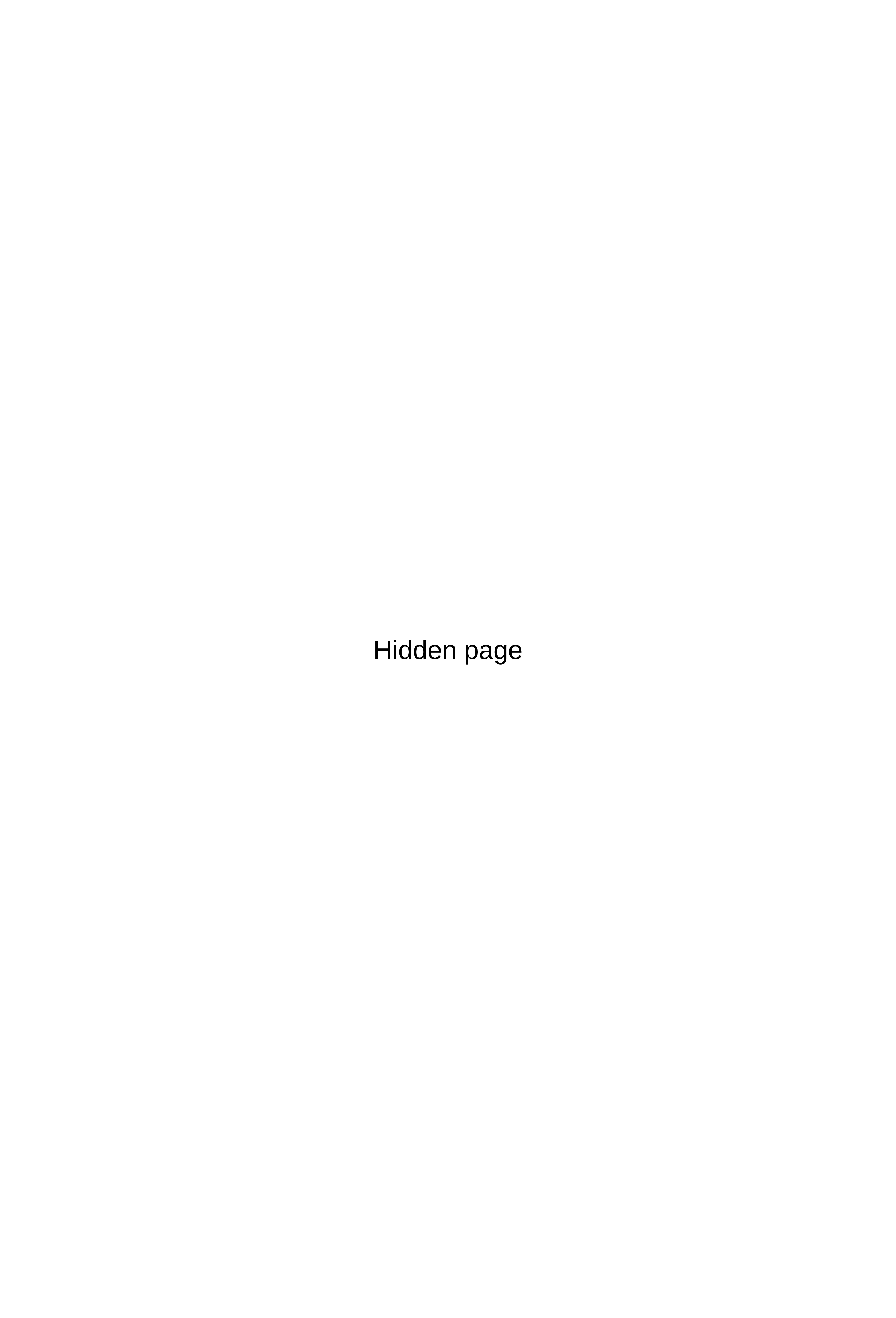


Figure 31.14. *Fucus vesiculosus* (Phéophycées – Fucacées).
Cette algue adhère au substratum rocheux par une base discoïde munie de crampons, engendrant le stipe presque cylindrique, s'aplatissant en une lame plane (ou fronde) parcourue jusqu'à son extrémité par une « nervure » médiane.
Cette lame dichotome porte, accolées deux à deux le long de la nervure, souvent d'une manière symétrique, des vésicules aérifères, renflées et ovoïdes.
La couleur olivâtre sur l'échantillon frais vire au noir ou brun-rouge dans l'herbier. Ce fucus mesure de 10 cm à 1 m de hauteur et de 0,5 à 4 cm de largeur.
Habitat : très commun sur nos côtes à mi-marée, fixé sur les rochers.



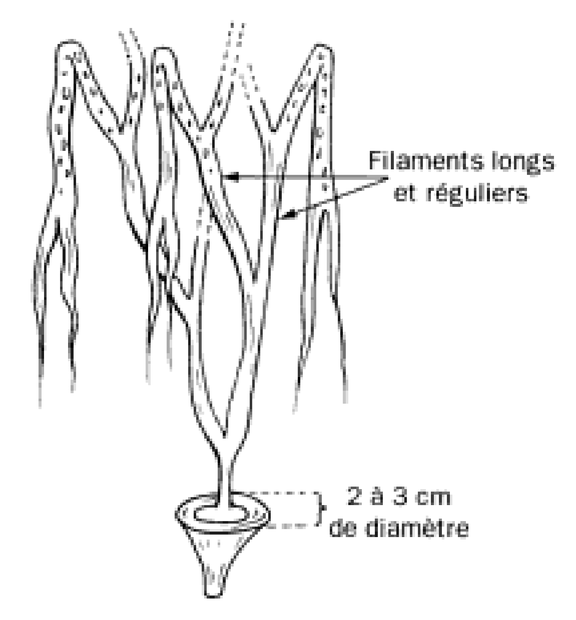


Figure 31.19. *Himanthalia lorea* (Phéophycées – Fucacées).
Au début de sa croissance, le thalle a la forme d'une petite vésicule renflée et pisiforme, quadrangulaire et transparente.
Par la suite, cette vésicule devient une coupe de petite taille (2 à 3 cm de diamètre) d'où émerge un filament linéaire, régulier, aplati, souvent dichotome long de 2 à 3 m et large de 1 cm.
Ces lames olivâtres sont les réceptacles fructifères, dispersés à l'intérieur en autant de cryptes pilifères, points noirs tranchant sur la couleur générale olive plus claire. Après fructification, ces filaments disparaissent. Il ne reste que la cupule noirâtre, d'apparence cornée, qui forme la partie végétative de l'algue.
Habitat : là où elle vit, l'algue grandit presque seule, ses longues lanières fort glissantes se couchent sur les rochers du large à marée basse.

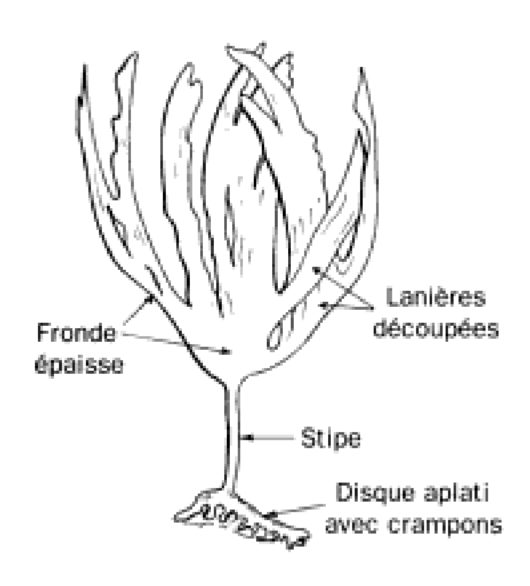


Figure 31.20. *Laminaria hyperborea* (Phéophycées – Laminariacées).
Le stipe part d'un disque aplati fixé au rocher par des crampons coriaces. Il se dresse ensuite verticalement, terminé par une fronde immédiatement très large et divisée en nombreuses lanières diversement découpées.
Cette fronde est ovale, épaisse, de la consistance d'un cuir ; elle atteint de 1,30 à 2 m de haut ; sa couleur est vert olive.
Habitat : sur les rochers qui ne découvrent qu'aux plus basses mers. Manche et océan.

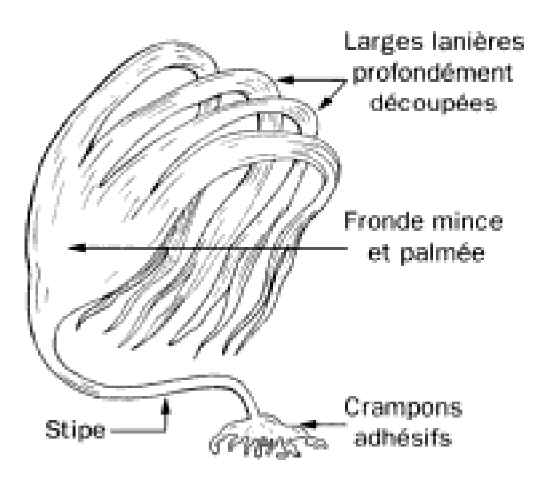


Figure 31.21. *Laminaria flexicaulis* (Phéophycées – Laminariacées).
Le stipe cylindrique et lisse est fixé au support rocheux par une série de filaments enchevêtrés formant un dôme ramifié.
La fronde mince et palmée est souvent déchirée en lames larges. Cette algue est souple et, à marée basse, la fronde est couchée sur le sol. Elle peut atteindre 2 m de longueur.
Habitat : sur les rochers qui découvrent à très basse marée.

Figure 31.22. *Laminaria saccharina* (Phéophycées – Laminariacées).
A partir d'un ensemble de crampons qui le fixent au rocher, le stipe plein et cylindrique mesure 30 cm environ avant d'évoluer en une fronde foliacée et allongée pouvant atteindre 30 à 40 cm de large sur 2 à 3 m de longueur.
Cette fronde coriace et lisse est ondulée sur les bords ; sa surface gondolée est couverte de petites pustules (qui éclatent lorsque l'algue est lavée à l'eau douce).
Habitat : très commune sur les côtes de France, sur les rochers à très basse mer, en septembre en particulier.

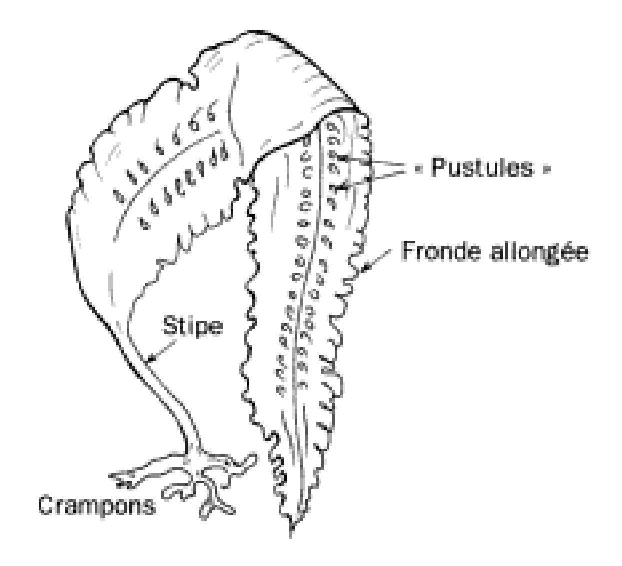


Figure 31.23. *Sacchorhiza bulbosa* (Phéophycées – Laminariacées).
Algue annuelle, elle effectue sa croissance en mars et disparaît à la même période. Son thalle atteint 1 m de haut. Un disque basilaire formé d'un enchevêtrement de crampons est surmonté d'un renflement tuberculeux hérissé de petites tubérosités (atteignant 20 à 25 cm de diamètre transversal à l'état adulte).
Au-dessus du stipe ondulé et plissé sur ses bords, la large fronde est souvent palmée et déchirée.
Habitat : algue fixée sur les rochers qui découvrent à très basse mer, sur les bouées, etc., toujours recouverts d'eau.

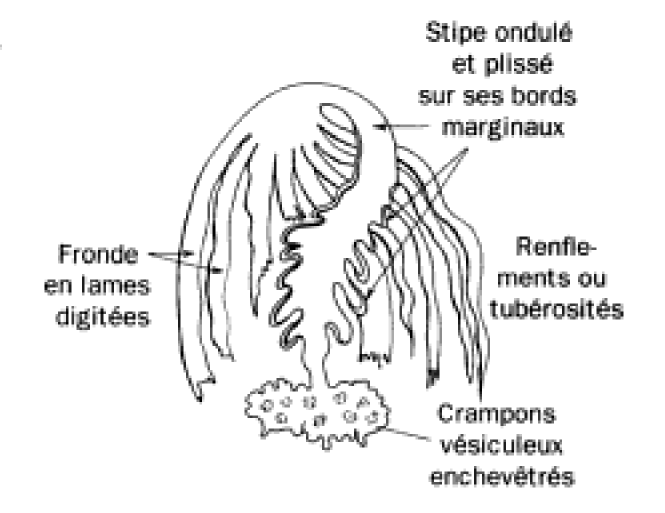
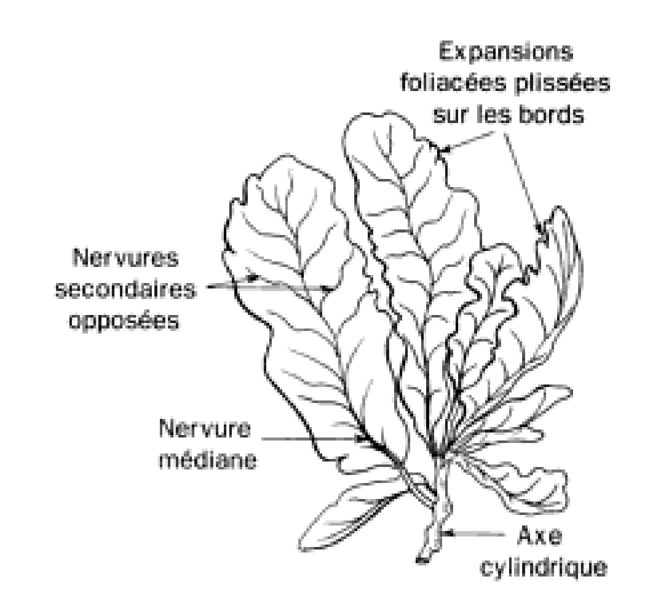


Figure 31.24. *Delesseria sanguinea* (Rhodophycées – Délessériées).
Thalle rouge vif, rose et jaunâtre dans les parties âgées, formé d'un axe cylindrique portant des expansions foliacées, lancéolées, plissées sur les bords, traversées par une nervure médiane et de petites nervures secondaires opposées (analogie avec la nervation pennée des Angiospermes !).
Le long de la nervure médiane naissent des folioles de même aspect et spatulées.
Habitat : cette algue est toujours rejetée en épaves, déchirée et réduite souvent à sa nervure médiane.



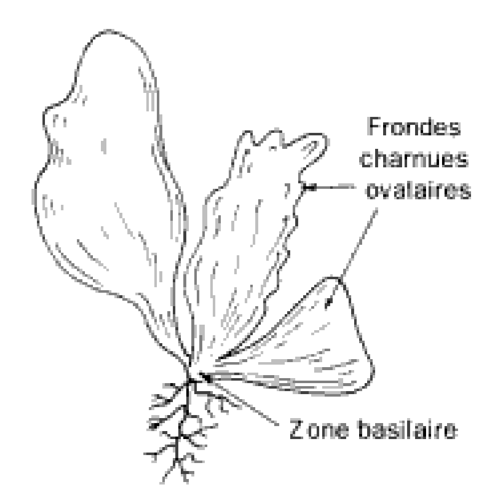


Figure 31.25. *Sarcophyllis edulis* (Rhodophycées – Dumontiacées).
Touffe de frondes partant d'une étroite zone basilaire. Ses lames consistantes et charnues d'un beau rouge brun sont planes, allongées et ovalaires.
Ce végétal atteint 25 à 50 cm de haut pour 5 à 15 cm de large.
Les frondes sont souvent déchirées sur leur longueur, ce qui est accidentel, mais aussi perforées par les mollusques qui en font leur nourriture.
D'ailleurs, abondante dans les mers boréales, elle a autrefois servi à l'alimentation humaine, son goût faiblement poivré faisant un contraste agréable avec d'autres espèces comestibles souvent fades.
Habitat : dans la partie la plus basse des marées parmi les trous de rochers, sur nos côtes du littoral.

Après une cueillette rapide, on regagne prudemment un niveau plus élevé où l'on reconnaît l'*Himanthalia elongata*. Là où se trouve cette algue, sur les rochers du large découverts à marée basse à l'automne, elle croît pratiquement seule, ses longs rubans très glissants se couchent à marée basse formant un tapis mou et dangereux.
Jeter un coup d'œil aux vases molles et sales des fonds des ports où s'observent des algues vertes (déjà mentionnées plus haut) telles les lames étalées, délicates et membraneuses des *Ulva lactuca*, entourées éventuellement des amas de rubans vert clair des *Enteromorpha compressa*, etc.
On retourne sur la terre ferme en évitant que les algues récoltées ne baignent dans un excédent d'eau de mer qui accélérerait leur décomposition. S'il fait chaud, ne pas oublier de recouvrir le tout d'un fragment de Laminaire qui les protège des rayons du soleil.
Visiter également avec soin les plages de sable dur sur lesquelles les ruisselets d'eau douce forment de petites rigoles où se prélassent les jolis éventails du *Padina pavonia (fig. 31.26)*, algues brunes à l'aspect spécial, bien identifiables avec leur teinte gris verdâtre et leur organisation en cornet à moitié enroulé.
Les individus jamais isolés forment des tapis dans lesquels les thalles (4 à 10 cm de hauteur), en nombre variable, sont contigus. Cet aspect résulte de la présence d'un système rampant sur lequel prolifèrent plusieurs thalles dressés, cylindriques à l'état jeune.

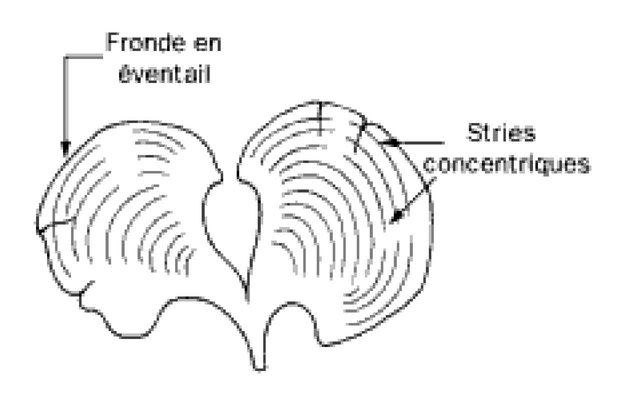
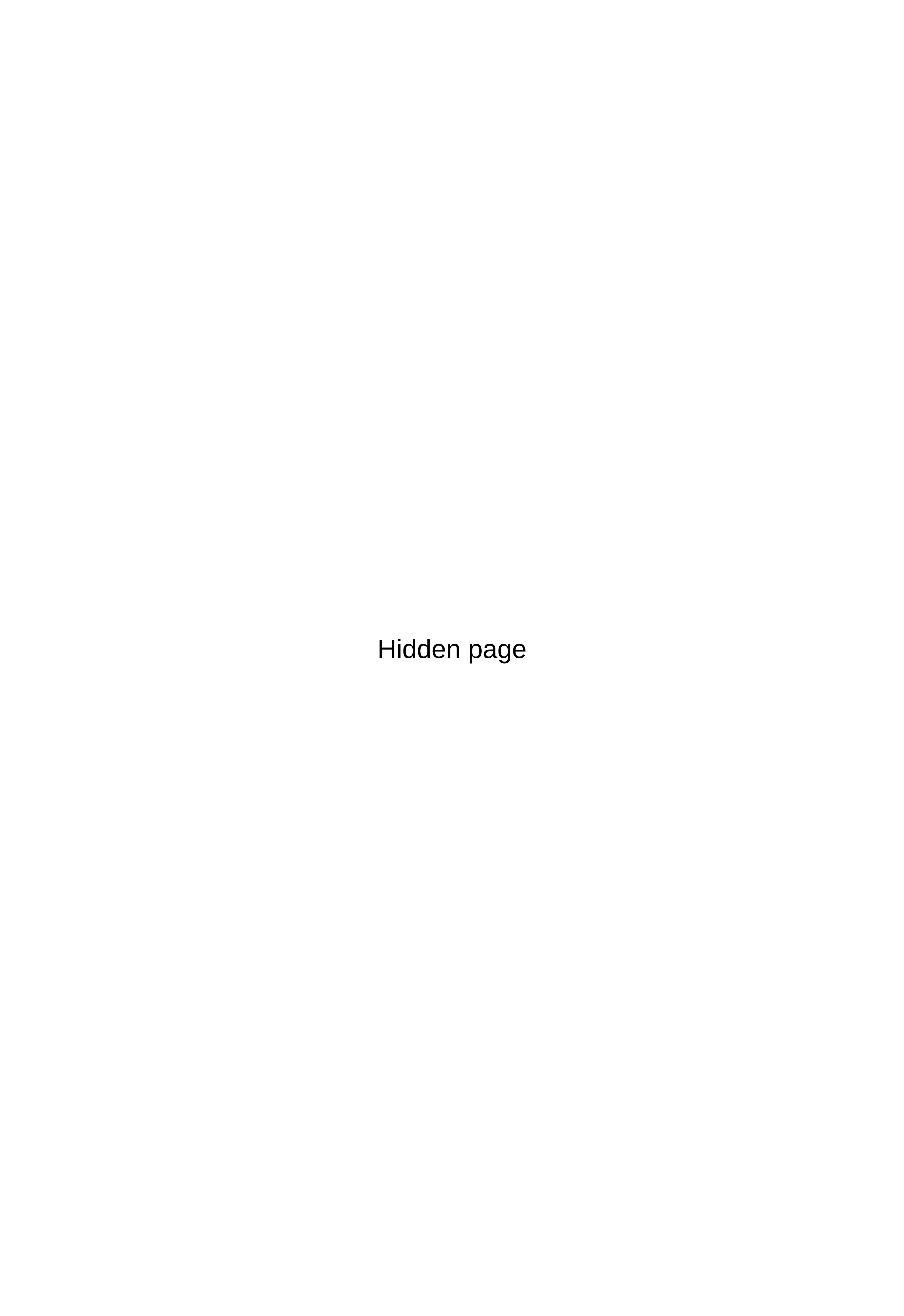


Figure 31.26. *Padina pavonia* (Phéophycées – Dictyotées).
Thalle de 4 à 10 cm de hauteur avec un feutrage de filaments basaux garnis de rhizoïdes. La fronde a la forme d'un éventail ou d'un cornet. Les diverses frondes se recouvrent les unes les autres, souvent en partie déchirées.
Chaque fronde est zonée de stries concentriques, constituées de taches brunes imprégnées de calcaire, ce qui lui confère une teinte grisâtre (quelques zones sont d'ailleurs d'un blanc verdâtre).
Habitat : sur les pierres dans les flaques d'eau exposées au soleil et de faible profondeur, ainsi que dans les rigoles où l'eau coule en abondance.

Les frondes présentent des stries concentriques sombres formées de filaments courts alternant avec des parties claires, voire blanchâtres, par suite d'une faible incrustation de calcaire.

Conclusion

La confection d'un herbier d'algues marines permet de mieux connaître ces végétaux qui ne se cantonnent pas uniquement au domaine aquatique salé. Les eaux douces ont également leurs représentants, des algues vertes en particulier (voir VI.31.2).
De plus, en dehors des lichens qui sont une association symbiotique d'algues et de champignons, existent de véritables algues terrestres. On en trouve sur les troncs d'arbres (voir VI.31.4) où il est « facile » de les confondre avec les mousses, sur la neige des montagnes à laquelle elles communiquent une teinte rosée, etc.
Par ailleurs, la diversité des algues explique la nécessité de les identifier, puis de les regrouper et de les classer (dans un herbier par exemple !) en vue d'avoir une idée aussi claire que possible de ce groupe de Thallophytes chlorophylliens, apparus depuis fort longtemps à la surface de la Terre et dont l'importance dans l'économie humaine augmente sans cesse (alimentation humaine et animale, engrais, cosmétologie, médecine, etc.).


Hidden page

Résultats, observations et interprétation

Les spores directes ou conidies sont alignées en chapelets à l'extrémité de filaments dressés, ramifiés, cloisonnés en articles plurinucléés. Leur aspect de minuscule pinceau verdâtre a donné son nom au *Penicillium (fig. 32.1)*.

Les conidies sont produites en très grande quantité par suite de l'étranglement « rythmique » *(fig. 32.2)* accompagné d'une division nucléaire de l'extrémité des filaments (extrémité encore appelée phialide).

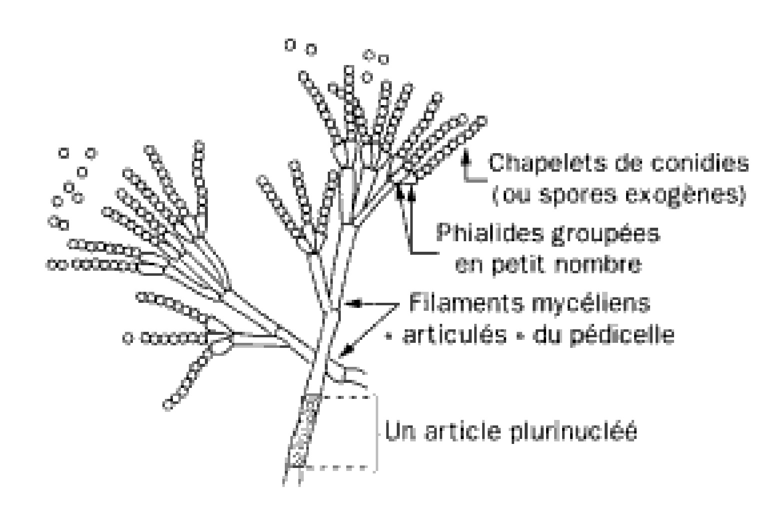


Figure 32.1. Fragment du mycélium d'un *Penicillium* (× 500).

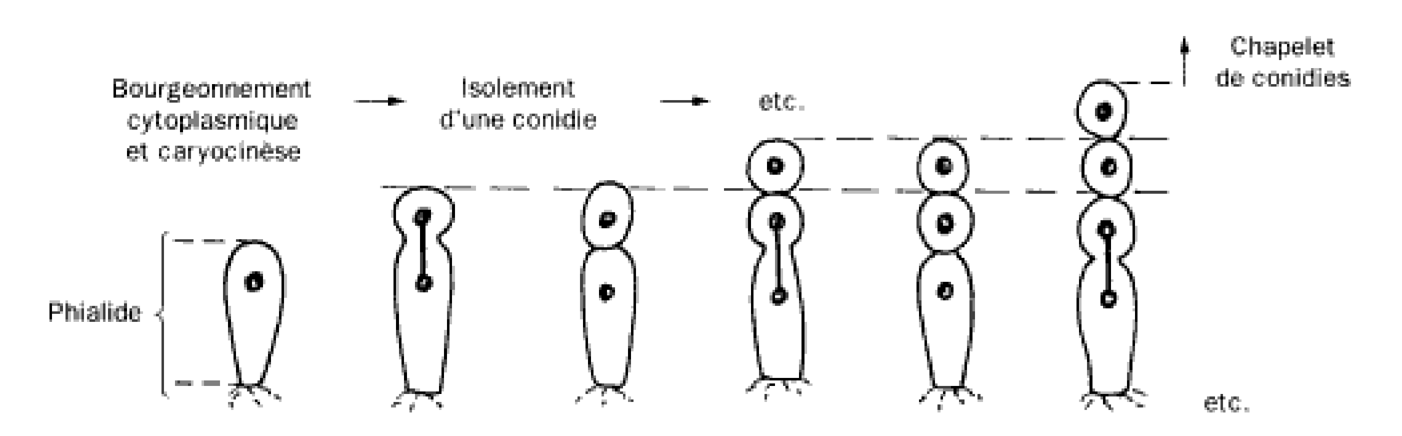


Figure 32.2. Fonctionnement d'une phialide.

Conclusion

Le *Penicillium*, bien connu pour ses utilisations médicamenteuses, se multiplie et se propage à l'aide de spores directes ou conidies (à la manière de la moisissure noire, etc.).
Le cloisonnement de son mycélium en fait néanmoins un Champignon supérieur cloisonné ou Septomycète.

Pincer l'échantillon prélevé entre deux demi-cylindres de moelle de sureau et ne pas trop appuyer car l'ensemble reste fragile.
Placer l'hyménium coloré vers le pouce afin de faire les coupes de la base de l'apothécie vers le bord libre hyménial.
Apporter beaucoup de soin dans la confection des coupes. Les monter ensuite dans l'eau distillée. Repérer les petits groupes d'asques dispersés : pour cela, il faut écraser légèrement les coupes en appuyant sur leur lamelle. Examiner et dessiner.
Remarque : si les coupes semblent difficiles à fabriquer, il est possible de prélever un fragment d'hyménium à l'aide d'une pince fine à bouts pointus, enfoncée à la base de la face luisante assez profondément pour récupérer également un peu de plectenchyme.
Monter alors dans une goutte d'eau distillée. Observer facilement les paraphyses et les asques de l'hyménium.

Résultats, observations et interprétation

Faire une représentation conventionnelle du plectenchyme, fort peu « lisible » sur la préparation.
Sur un dessin, figurer trois ou quatre asques typiques, renfermant leurs huit ascospores granuleuses, translucides à l'état jeune ou bien lisses à paroi orangée épaisse à maturité, disposées en séries ordonnées *(fig. 32.4)*.

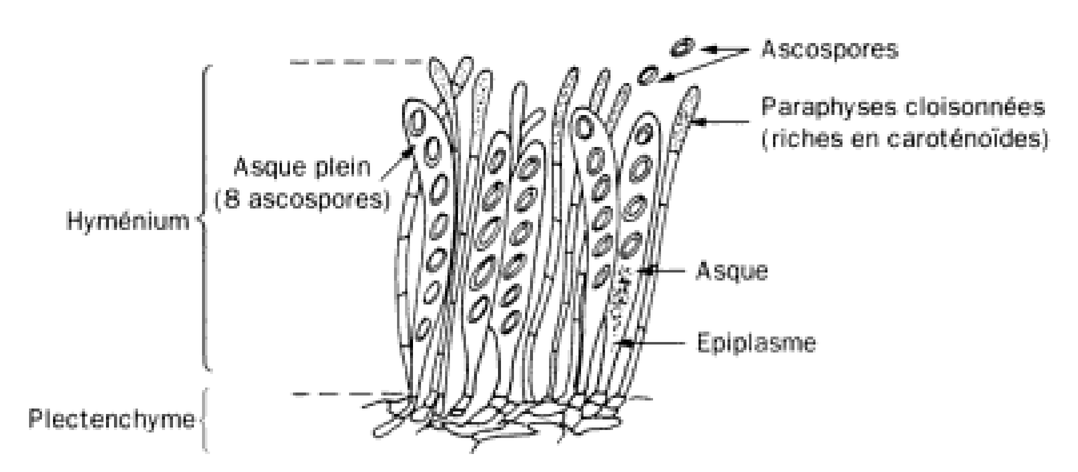
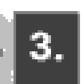


Figure 32.4. Fragment d'hyménium de Pézize (× 750).

Essayer de repérer l'opercule, couvercle par où s'échappent les ascospores à maturité.
Des asques peuvent être dépourvus d'ascospores, mais remplis de cytoplasme par suite de l'avortement du « noyau de fécondation ».
Dans les asques typiques, les ascospores sont plongées dans un épiplasme, résidu cytoplasmique riche en gouttelettes lipidiques.
Examiner attentivement les ascospores : leur forme, leur couleur et leur ornementation sont caractéristiques de chaque espèce de pézize.
Quant aux paraphyses, ce sont des éléments stériles, cloisonnés (rappelant la systématique des Champignons Septomycètes), diversement colorés (sous forme d'inclusions de pigments caroténoïdes) dont l'article terminal est renflé à contenu granuleux.

Conclusion

La Pézize fait partie des champignons supérieurs ou Septomycètes du groupe des Ascomycètes dont la reproduction sexuée comporte des ascospores endogènes, sexuées, haploïdes portées par un type de sporocyste particulier, l'asque.



3. Un champignon ascomycète : la Truffe

Mots clés

Mycorhize, asque, ascospore.

Principe

Au sein des Ascomycètes (voir VI.32.2), la truffe est originale à plus d'un titre :
- ce champignon souterrain se développe à proximité des chênes dans le Sud-Ouest de la France ;
- son mycélium vit en symbiose avec les racines du chêne qu'il entoure localement d'un manchon blanchâtre (formant des mycorhizes chêne-truffe) ; de place en place, se forment des fructifications ou truffes comestibles !
- les asques sont sphériques, mêlés aux filaments stériles du plectenchyme (au lieu d'être alignés parallèlement entre eux et les paraphyses) ; le nombre d'ascospores varie de un à quatre, jamais huit !

Sécurité

Cette manipulation ne présente aucun danger.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

Truffe entière ou morceau de truffe fraîche ou conservée en boîte, même extrait d'un pâté de charcuterie.

■ ***Matériel***

- Microscope.
- Lames et lamelles.
- Lame de rasoir.
- Aiguille lancéolée.
- Pinces fines.

Mode opératoire

La truffe est une masse globuleuse de quelques centimètres de diamètre, pratiquement noire, à surface verruqueuse, de consistance caoutchouteuse.

Avec une lame de rasoir, réaliser une série de coupes minces d'orientation quelconque qui montrent :
- une écorce, mince et sombre ;
- une moelle ou « chair », noir violacé, traversée d'un ensemble de veines plus claires, ramifiées et fines *(fig. 32.5)*.

Les monter dans l'eau entre lame et lamelle. Explorer essentiellement les bords d'une coupe, au fort grossissement du microscope. Observer et dessiner.

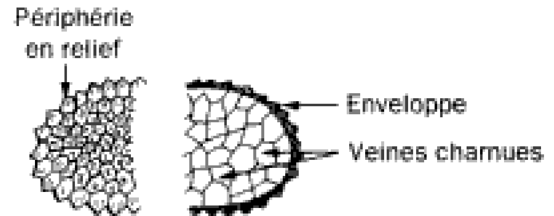


Figure 32.5. Une truffe : fructification souterraine (vue externe à gauche, en coupe à droite).

Résultats, observations et interprétation

Les « veines » sont occupées par des filaments cloisonnés (type Septomycètes) comme chez le champignon de couche. Dans les mailles du réseau, ces filaments entourent des

asques dont la cavité contient souvent trois ou quatre ascospores à paroi dorée et ornée d'épines.

Ici, en effet, contrairement au cas classique de la pézize (voir VI.32.2), les asques sont sphériques, enchevêtrés dans les filaments stériles du plectenchyme au lieu d'être alignés parallèlement entre eux et avec les paraphyses.

Au fort grossissement, envisager si possible les épisodes suivants *(fig. 32.6)* :

– rechercher un asque « vide » ; observer alors sa paroi épaisse (la représenter par deux traits sinon seule la limite de la cavité ménagée dans le plectenchyme est indiquée !) ;
– explorer un asque très jeune dont les ascospores en formation sont encore translucides (observation d'un épiplasme comme chez la pézize) ;
– identifier un asque « mûr » avec de une à quatre ascospores brunâtres *(fig. 32.7)* à paroi hérissée de pointes (on parle d'une paroi échinulée) ;
– détailler le plectenchyme entourant les asques ; il est fait de filaments enchevêtrés, cloisonnés (type Septomycètes) dont quelques-uns se terminant en ampoule renflée ont valeur de filaments ascogènes (leur article terminal étant devenu entre-temps un asque).

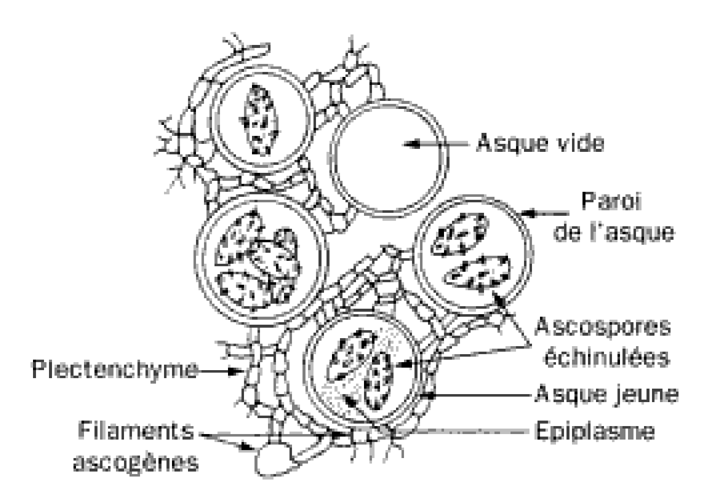


Figure 32.6. Plectenchyme et asques de la truffe (× 450).

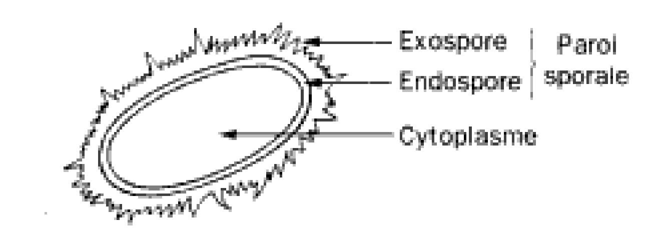


Figure 32.7. Une ascospore isolée.

Conclusion

Les spores en germant donnent un mycélium souterrain brunâtre qui doit vivre en symbiose avec les racines d'un chêne (mycorhizes). Le mycélium entoure la racine et pénètre sa périphérie. Lorsque les fructifications sont mûres, le mycélium producteur a complètement dégénéré.

4. La levure de bière, champignon industriel

Mots clés

Bourgeonnement, fermentation.

Principe

Au sein des champignons, les levures unicellulaires et microscopiques occupent une place à part fort originale (voir III.13.3).

Sécurité

Cette manipulation ne présente aucun danger.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***
Levure de boulangerie ou bien ultralevure achetée en pharmacie.

■ ***Réactifs***
– Rouge neutre.
– Solution glucosée à 10 %.
– Eau iodée.

■ ***Matériel***
– Microscope.
– Lames et lamelles.
– Pipette.

Mode opératoire

Se procurer de la levure de boulangerie, variété de levure capable de vivre au ralenti dans un substratum solide.
En diluer un fragment dans une solution glucosée à 10 %, quelques heures avant l'observation ; les individus de la levure retrouvent alors une vie active.
Remarque : l'ultralevure obtenue en pharmacie peut être aussi utilisée, de façon directe, dissoute dans un peu d'eau.

■ ***Observation directe***
A l'aide d'une pipette, étaler une goutte de la culture sur une lame. Recouvrir d'une lamelle et observer au fort grossissement du microscope.

■ ***Observation au rouge neutre***
Ajouter à une goutte de culture disposée sur une deuxième lame une goutte de rouge neutre. Recouvrir d'une lamelle et observer comme précédemment.

■ ***Fixation et coloration à l'eau iodée***
Ajouter enfin à une troisième lame supportant une autre goutte de culture de levure une goutte de réactif iodo-ioduré. Observer et dessiner.

Résultats, observations et interprétation

■ ***Etude directe***
Dans de bonnes conditions de nutrition, comme ici avec une culture de levures sur solution glucosée et aérée, les individus, cellules ovoïdes à contenu dense et clair, émettent à l'état adulte une protubérance dans laquelle s'engagent des constituants cytoplasmiques et un noyau-fils. Le bourgeon ainsi formé, minuscule cellule, se détache ou non

de la cellule-mère, suivant l'âge de la culture ; ainsi, dans de vieilles cultures, trouve-t-on de véritables chapelets de bourgeons !
Ce processus de bourgeonnement est le mécanisme de division des levures et, en conséquence, la forme de multiplication végétative qui assure la prolifération des individus au sein de la culture.
Remarque : en situation particulière (mauvaise nutrition, etc.), les levures se reproduisent par voie sexuée avec formation de sporocystes particuliers ou asques producteurs d'ascospores (d'où leur classement parmi les Champignons Ascomycètes).

■ ***Coloration vitale par le rouge neutre***
Elle permet d'observer à la fois le bourgeonnement et la présence d'une très petite vacuole dans le bourgeon, le rouge neutre colorant ici, comme chez les cellules végétales en général, le système vacuolaire. Chaque individu contient une ou deux petites vacuoles qui accumulent le colorant et deviennent de plus en plus visibles.
Des cellules peuvent être complètement rouges : ce sont des cellules mortes entièrement vacuolisées ou totalement perméables *(fig. 32.8)*.
Chez des individus âgés, des points plus colorés ou corpuscules métachromatiques se révèlent être des précipités vacuolaires.

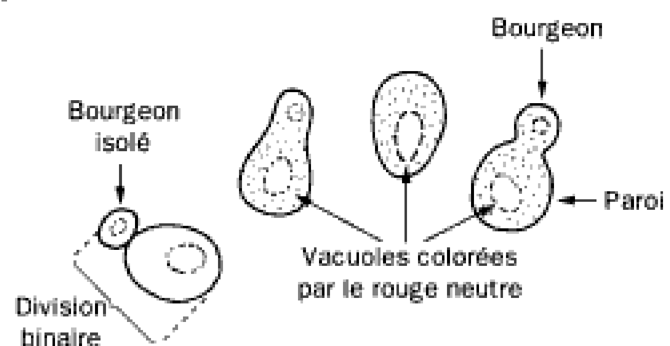


Figure 32.8. Individus de levure (× 900) colorés par le rouge neutre.

■ ***Fixation et coloration***
L'eau iodée tue les individus en les fixant et en les colorant *(fig. 32.9)*. Dans un cytoplasme figé, clair, s'observent des plages irrégulières de glycogène coloré en brun tant dans les cellules-mères que dans les bourgeons.
Ce polysaccharide de réserve, voisin de l'amidon et de l'inuline, est une forme d'accumulation glucidique peu fréquente chez les végétaux (les champignons exceptés), banale au contraire dans le domaine animal.
Le glycogène produit du glucose par hydrolyse et se trouve en pseudosolution dans les vacuoles.

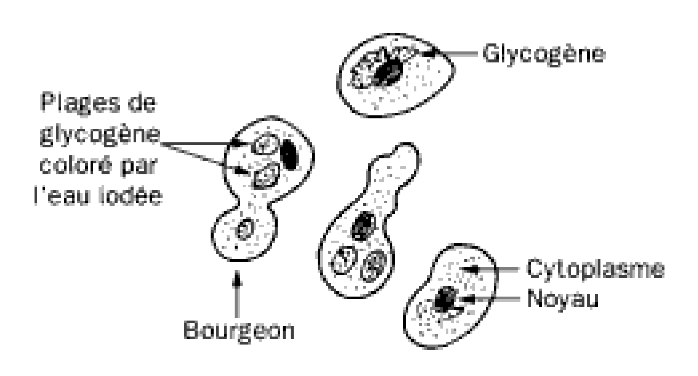
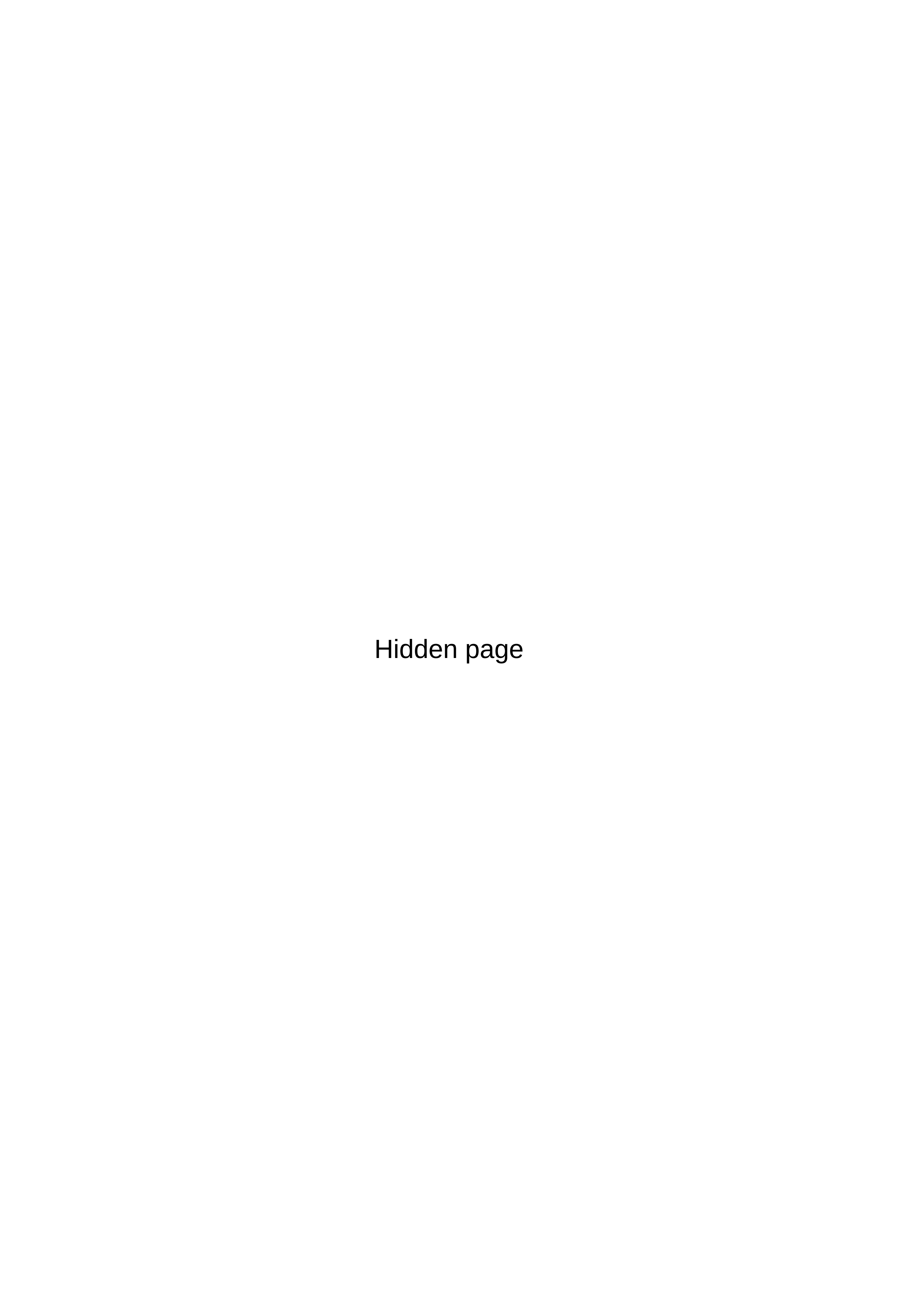


Figure 32.9. Individus de levure (× 900) colorés par l'eau iodée.

Conclusion

Les levures au thalle unicellulaire et non chlorophyllien font partie des champignons, végétaux hétérotrophes, incapables d'effectuer les réactions de photosynthèse. Ils se comportent en saprophytes empruntant à leur environnement les substances organiques qui leur sont nécessaires.
L'Homme utilise les levures comme agents de fermentation :
– dans les industries alimentaires (fabrication des boissons alcoolisées, du pain et des fromages fermentés) ;
– dans la préparation d'alcools industriels à partir de déchets agroalimentaires ou de résidus de l'industrie du papier.


Hidden page

■ ***Matériel***
– Microscope.
– Loupe binoculaire.
– Lames et lamelles.
– Verre de montre.
– Lame de rasoir.
– Pinces fines.
– Scalpel.
– Deux aiguilles montées.
– Eau distillée.

Mode opératoire

Examiner d'abord une série de trois ou quatre carpophores à divers stades de développement. Vérifier :
– le pied dressé verticalement au-dessus du sol, mais en continuité avec le mycélium souterrain ;
– le chapeau portant sur sa face inférieure des lamelles rayonnantes dont le pourtour ou hyménium porte les basidiospores, d'abord roses, puis noirâtres à maturité ;
– le voile général entourant complètement le jeune champignon et disparaissant rapidement et totalement par la suite ;
– le voile partiel réunissant, chez le jeune carpophore, le bord du chapeau au milieu du pied et persistant ensuite en formant l'anneau (ou bague).

Dessiner et annoter vos schémas.
Prélever un échantillon de la région moyenne et centrale du pied. Dilacérer le matériel à l'aide de deux aiguilles montées, dans une goutte d'eau installée au préalable sur une lame.
Recouvrir d'une lamelle et observer au fort grossissement du microscope.
Pratiquer au scalpel une section sous-tangentielle du bord du chapeau. Mettre alors de l'eau sur le rasoir afin de conserver beaucoup de basidiospores en place.
Tenir horizontalement la section effectuée dans le chapeau, les lamelles vers soi et couper perpendiculairement aux lamelles. La difficulté tient à la fabrication des coupes. Celles-ci réalisées, les faire glisser du rasoir sur la lame, sans les sortir de l'eau, et recouvrir d'une lamelle.
Observer au faible puis au fort grossissement du microscope et dessiner ce qui vous semble le plus intéressant.

Résultats, observations et interprétation

Le pied, comme le reste du carpophore, n'est pas un véritable tissu végétal, mais plutôt une sorte de feutrage de filaments mycéliens enchevêtrés formant un faux-tissu ou plectenchyme *(fig. 32.11 et 32.12)*.
Au faible grossissement, observation et dessin des lamelles. Etant longues et flexueuses, il est pratiquement impossible de les voir sur toute leur longueur.
Elles sont tapissées sur toute leur surface par l'hyménium *(fig. 32.13)*, repérable par les basidiospores. En principe, quatre basidiospores par baside, mais ici deux seulement.

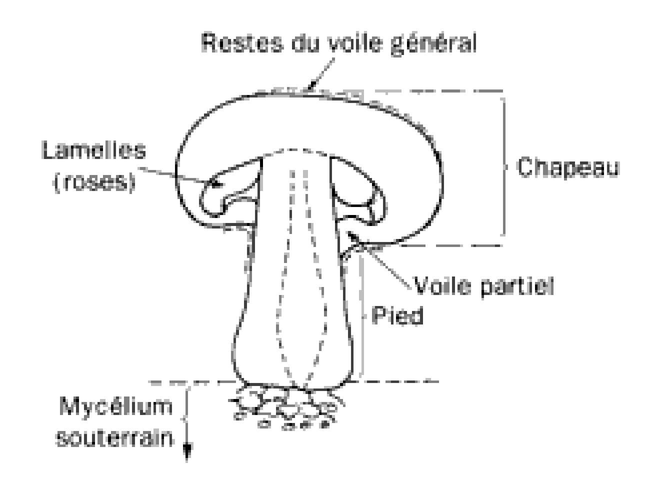


Figure 32.11. Organisation d'un carpophore (coupe verticale).

La présence de bulles d'air entre les lamelles peut nuire à l'observation. S'assurer que l'hyménium est bien sectionné, non obliquement, et entouré d'eau et non d'air.
Opérer de préférence au fond des lamelles, dans leur concavité.
Au fort grossissement, si la coupe est de bonne qualité, repérer les cloisonnements des filaments du plectenchyme et leur allongement dans l'axe des lamelles, puis leur redressement (après caryogamie) pour constituer l'hyménium.

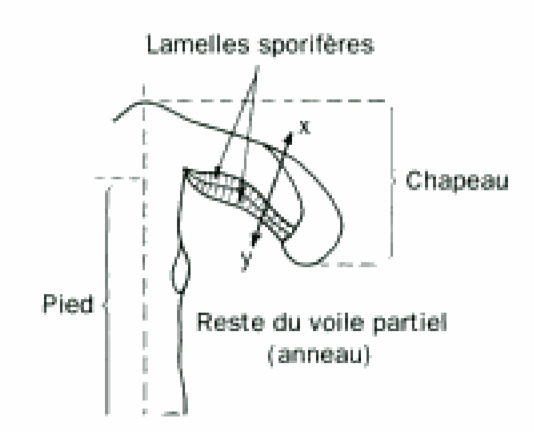


Figure 32.12. Disposition des lamelles portant l'hyménium.

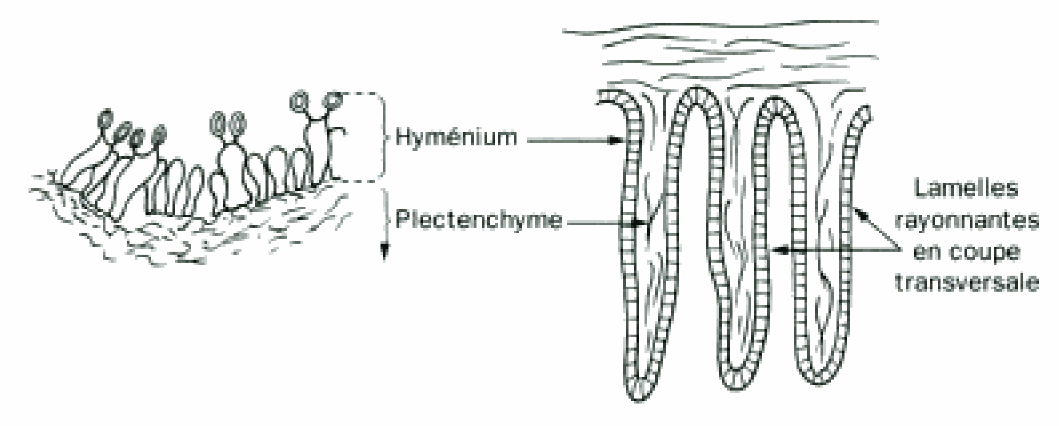


Figure 32.13. Hyménium de Basidiomycète disposé à la surface des lamelles du carpophore.

Les basides *(fig. 32.14)* sont un peu plus hautes que les éléments stériles ayant valeur de paraphyses (basidioles, etc.). Elles sont vues de face avec leurs deux pointes, ou stérigmates, ou de profil avec un seul stérigmate.
Beaucoup de basides sont dépourvues de basidiospores : elles se sont détachées au moment de la manipulation.

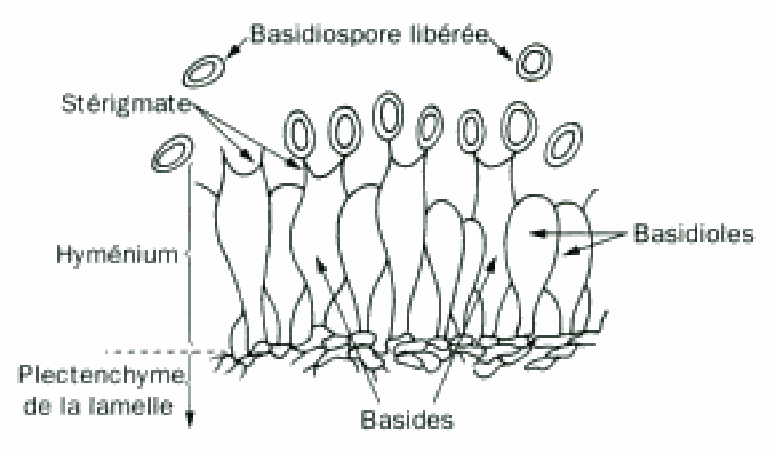


Figure 32.14. Composition d'un hyménium.

Conclusion

Les Basidiomycètes sont des champignons supérieurs ou Septomycètes chez lesquels la reproduction sexuée comporte des basidiospores, spores exogènes (installées à l'extrémité d'un stérigmate), sexuées, haploïdes portées par un sporocyste particulier, la baside.

1. La tige feuillée d'une mousse : le Polytric

Mots clés

Axe feuillé, rhizoïde, reviviscence.

Principe

Le Polytric élégant *(Polytrichum formosum)* est une mousse de « grande » taille (10 à 15 cm de hauteur) installant des touffes clairsemées, d'un vert sombre, sur le sol frais et ombragé des forêts ; il affectionne les terrains siliceux.

Chaque pied de mousse est formé d'un axe feuillé vertical dont la base est noire ou brune au contact du sol, entourée de feuilles noirâtres en décomposition et dont le sommet est vert et agrémenté de petites feuilles chlorophylliennes raides.

La fixation au sol, assez faible d'ailleurs, est assurée par des filaments peu colorés ou brunâtres, les rhizoïdes.

Sécurité

Cette manipulation ne présente aucun danger.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

Echantillons de Polytric ou, à défaut, de Funaire, d'Hypnum, etc.

■ ***Réactifs***

Carmin-vert d'iode (voir IV.21.7).

■ ***Matériel***

- Loupe binoculaire.
- Microscope.
- Lames et lamelles.
- Verres de montre.
- Aiguille montée.
- Pinces fines.
- Lame de rasoir.
- Moelle de sureau.
- Eau glycérinée.

Mode opératoire

Observer, à la loupe binoculaire, l'axe feuillé, élément cylindrique dressé entouré de feuilles nombreuses à base embrassante (ou gaine) et à extrémité pointue ; la racine est « remplacée » par des rhizoïdes *(fig. 33.1)*.

Réaliser, à l'aide d'une lame de rasoir, une série de coupes transversales dans la région moyenne d'un axe feuillé ayant au préalable été pincé entre deux demi-cylindres de moelle de sureau. Couper simultanément l'axe et les feuilles.

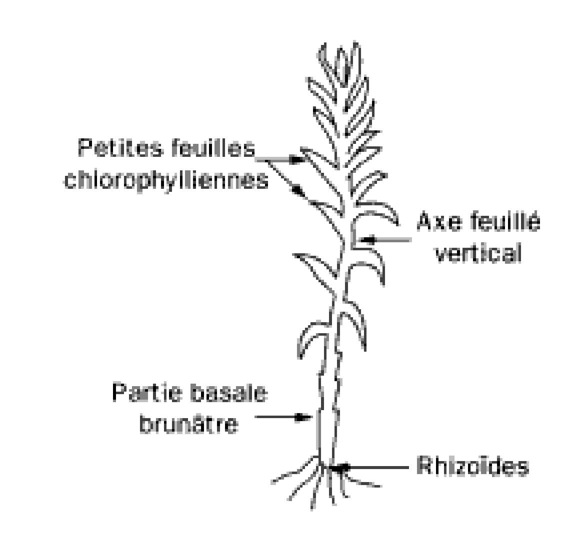


Figure 33.1. Un échantillon de Polytric.



2. Les organes mâles ou anthéridies d'une mousse : le Polytric

Mots clés

Anthéridie, cellule spermatogène, spermatozoïde.

Principe

La mousse *Polytrichum formosum* est bien répandue dans nos régions. La « tige » est simple et porte des feuilles étroites dont celles du sommet feuillé s'allongent beaucoup, se chevauchent partiellement et forment une sorte de corbeille, ou involucre *(fig. 33.4)*. Ces feuilles involucrales sont vert sombre, dentées et leurs cellules dessinent des rangées obliques.
Protégés par cet involucre de feuilles, les organes sexuels mâles ou anthéridies occupent ainsi le sommet de l'axe feuillé mâle d'une mousse *(fig. 33.5)*.

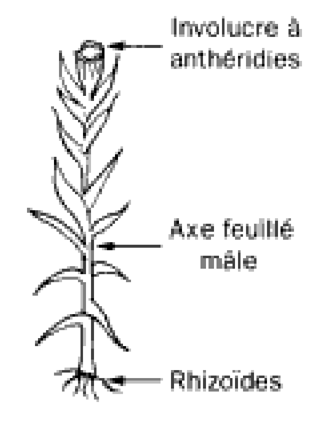


Figure 33.4. Pied mâle de Polytric.



Sécurité

Cette manipulation ne présente aucun danger.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***
Echantillons de Polytric (ou de Funaire, etc.) porteurs de corbeilles à anthéridies, récoltés au printemps en avril-mai.

■ ***Matériel***
- Loupe binoculaire.
- Microscope.
- Lame de rasoir.
- Aiguille lancéolée.
- Lames et lamelles.
- Pince fine.
- Eau distillée.

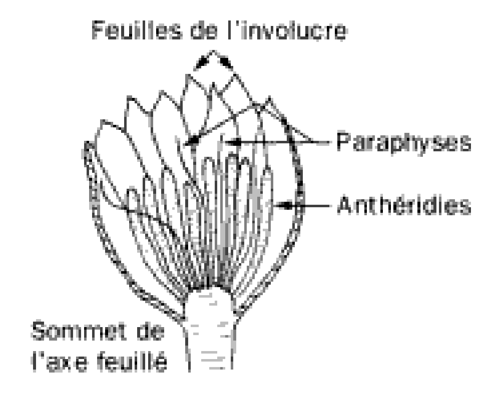


Figure 33.5. Sommet d'un axe feuillé mâle de Polytric.

Mode opératoire

Il consiste, à l'aide d'une lame de rasoir, à couper un sommet fertile dans le sens de la hauteur et à examiner l'une des deux moitiés à la loupe binoculaire.
Distinguer, au centre de l'involucre de feuilles, un important bouquet d'anthéridies mélangées à des filaments stériles ou paraphyses.
Avec une aiguille lancéolée, prélever une partie de ce bouquet et monter entre lame et lamelle dans une goutte d'eau.
Observer au faible, puis au fort grossissement du microscope et dessiner ensuite.
Remarque : on peut aussi arracher les organes sexuels à la pince. Pour cela, enfoncer la pince fine dans le réceptacle de l'involucre, fermer et tirer, puis étaler le fragment obtenu dans une goutte d'eau étalée sur une lame. Recouvrir ensuite d'une lamelle. Observer au microscope et dessiner.
Ecraser doucement une anthéridie mûre dans une goutte d'eau et observer au fort grossissement.

Résultats, observations et interprétation

Les anthéridies du Polytric sont des sacs allongés, attachés directement sur le sommet renflé de l'axe feuillé *(fig. 33.6A)*. La paroi du sac anthéridial est formée d'une seule couche de cellules chlorophylliennes, régulières, rectangulaires dessinant des travées transversales sur l'anthéridie (et non obliques comme à propos des feuilles de l'involucre). Vers la base, les cellules s'allongent et forment le pédicelle de l'anthéridie. Au sommet au contraire, les cellules deviennent isodiamétriques, leurs parois étant très épaisses, et forment le capuchon.

A maturité, les parois des cellules sommitales se gélifient, entraînant la rupture du capuchon et assurant la libération des spermatozoïdes.

L'observation dépend beaucoup de l'état évolutif des anthéridies.

Leur contenu est d'aspect variable : opaque et fort peu distinct dans les organes jeunes (présence des cellules spermatogènes), nettement visible et un peu rougeâtre dans les organes mûrs (masse des spermatozoïdes), inexistant en cas de déhiscence spontanée ou provoquée.

Les spermatozoïdes prennent en effet naissance à partir de cellules centrales appelées cellules spermatogènes. Ici, elles apparaissent souvent contractées en une masse grisâtre qui rend opaque l'anthéridie (raison pour laquelle il ne faut pas confondre l'anthéridie avec une feuille involucrale).

Les cellules spermatogènes voient leur noyau s'allonger et se transformer en spermatozoïde si bien que, à maturité, les spermatozoïdes sont nombreux, peu volumineux et pourvus de deux flagelles *(fig. 33.6B)*. Chaque gamète mâle comporte un noyau légèrement spiralé entouré d'une mince couche de cytoplasme dans laquelle s'insèrent les flagelles (peu visibles, mais que l'on imagine à la faveur des mouvements qu'ils procurent aux particules en suspension dans l'eau).

La paroi des cellules spermatogènes devient un mucilage qui, attirant l'eau extérieure, fait gonfler l'anthéridie dont la déchirure du capuchon assure la libération des spermatozoïdes nageurs.

Associés aux anthéridies se trouvent des filaments stériles (ou paraphyses) formés d'un pédicelle long et fin, lui-même formé d'une simple file de cellules à chloroplastes dont le sommet est élargi et aplati. A la manière des anthéridies, les paraphyses s'attachent directement sur l'extrémité du sommet feuillé.

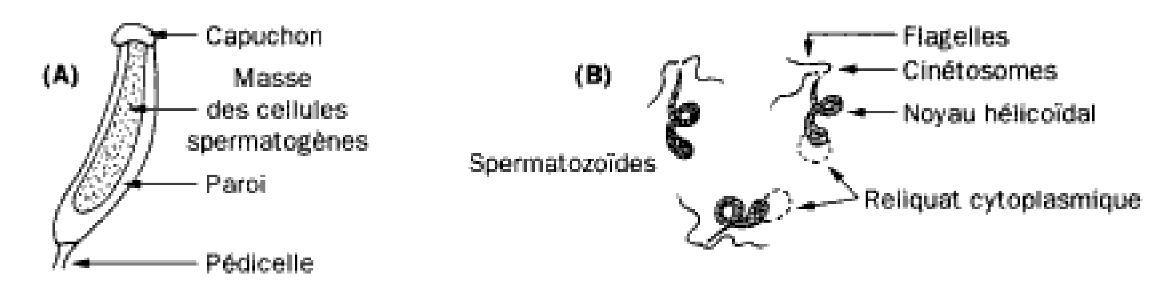
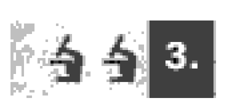


Figure 33.6. Anthéridie et spermatozoïdes de mousse.
(A) Anthéridie.
(B) Spermatozoïdes.

Conclusion

Importance de l'eau lors de la reproduction sexuée (maturation et libération des spermatozoïdes nageurs, déplacement de ces derniers dans le vecteur aquatique à la recherche des gamètes complémentaires, etc.) si bien que la plupart des Bryophytes terrestres restent liés aux stations humides.



3. Le sporophyte (ou sporogone) d'une mousse : le Polytric

Mots clés

Sporogone, spore, capsule, péristome, spore.

Principe

Au sommet des axes feuillés femelles se forment des organes sexuels ou archégones *(fig. 33.7)* dont la petite taille et la brève durée d'existence rendent l'étude difficile et précaire.
Ce sont de minuscules bouteilles effilées *(fig. 33.8)* dont la partie basale élargie renferme le gamète femelle ou oosphère.
Celle-ci, fécondée par un spermatozoïde nageur (provenant des anthéridies d'un axe feuillé mâle) à la faveur de l'eau recouvrant une touffe de Polytric (eau de pluie ou de rosée), engendre une cellule-œuf ou zygote qui germe sur place en produisant le sporogone issu de la fécondation, représentant le sporophyte, génération productrice des spores fabriquées et disséminées par une capsule.

Feuilles de l'involucre
Archégone
Paraphyses
Sommet de l'axe feuillé

Figure 33.7. Extrémité d'un axe feuillé femelle.

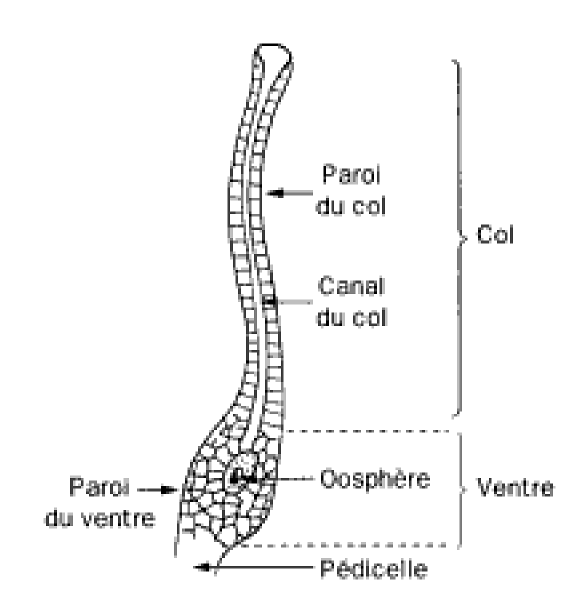


Figure 33.8. L'archégone du Polytric.

Sécurité

Cette manipulation ne présente aucun danger.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

Echantillons de Polytric, de Funaire ou mousse similaire, surmontés d'un sporogone. De préférence, récolter des sporogones jeunes aux capsules fraîches, presque mûres au mois de mai. Ils dérivent chacun d'un embryon né à la suite d'une fécondation de l'année précédente.

■ ***Matériel***

- Microscope.
- Loupe binoculaire.
- Lame et lamelle.
- Lame de rasoir.
- Pinces fines.
- Eau distillée.

Mode opératoire

A la loupe binoculaire, inventorier la soie et son renflement terminal ou capsule dont l'ensemble forme la partie visible du sporogone de la mousse.

Réaliser, avec une lame de rasoir, des coupes transversales dans la fine soie (en s'aidant de moitiés de cylindre de moelle de sureau) et monter entre lame et lamelle dans une goutte d'eau distillée. En observer la structure anatomique.
Toujours à l'aide d'une lame de rasoir, faire ensuite une série de coupes transversales et longitudinales dans une capsule encore verte, donc jeune ; de même, effectuer une coupe transversale dans une capsule brune, mûre, apte à disperser ses spores.
Monter entre lame et lamelle dans une goutte d'eau. Observer et choisir les meilleures en vue de réaliser des dessins d'observation.

Résultats, observations et interprétation

■ ***Etude à la loupe binoculaire***

Le sporogone comprend *(fig. 33.9)* une longue soie grêle, verte puis rougeâtre (6 à 8 cm de longueur), prolongée par la capsule de forme prismatique surmontée d'une coiffe brune, en pointe au sommet et frangée à sa base (la coiffe correspond à la partie supérieure déchirée de l'ancien archégone). A sa base, un sillon annulaire la sépare de l'apophyse, expansion de la soie. A son extrémité apicale, un deuxième sillon la sépare de l'opercule de forme pointue. A son autre extrémité, la soie s'enfonce dans le sommet de l'axe feuillé femelle : ce pied ou suçoir traduit le parasitisme physiologique qui existe entre le sporogone et l'axe feuillé végétatif.
Avec une pince, enlever la coiffe afin de voir l'opercule, petit couvercle conique qui se détache au moment de la déhiscence, c'est-à-dire lors de la dispersion des spores.
Enlever cet opercule en le faisant basculer avec des pinces fines.
L'orifice de la capsule rougeâtre est encore obturé par un diaphragme, disque mince que les 64 dents triangulaires et pointues du péristome, insérées sur la périphérie du sommet de la capsule, maintiennent en place.
Dans les conditions naturelles, une fois l'opercule tombé avec la coiffe, l'ouverture de la capsule nécessite encore la chute du diaphragme et l'écartement des dents du péristome.
Par temps sec, les dents se recourbent vers l'extérieur et les spores s'échappent lorsque le vent ou un choc secouent la capsule. Au contraire, une pluie (ou même l'humidité atmosphérique) rabat les languettes sur la cavité capsulaire et empêche momentanément la dispersion des spores.
En effet, la capsule a valeur d'un sporange (voir VI.34.2).

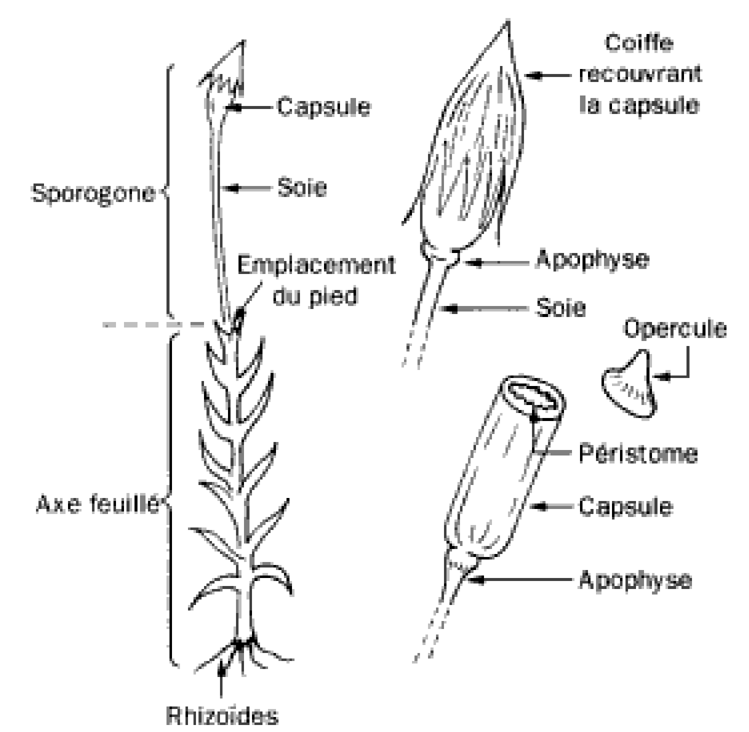


Figure 33.9. Relations sporophyte-gamétophyte.

■ ***Etude au microscope***

• *La soie*

Une coupe transversale de la soie *(fig. 33.10)* montre une structure presque plus complexe que celle de la tige feuillée, comparable en cela à celle des organes des plantes vasculaires ou Trachéophytes, à savoir :

Les spores sont minuscules (20 µm) et très nombreuses ; au fort grossissement, elles apparaissent claires et réfringentes.
De même, en coupe longitudinale *(fig. 33.11A)*, la capsule confirme l'examen précédent avec ses différents tissus ; mais, en plus, l'observation de la région terminale de la capsule confirme :
– le diaphragme, lame transversale de parenchyme ;
– le péristome, tronc de cône surbaissé associant le diaphragme à la partie latérale de la capsule ;
– l'opercule, structure elle aussi conique surmontant le tout.

Conclusion

La germination des spores s'effectue sur le sol humide. Chacune produit un thalle filamenteux, chlorophyllien : le protonéma, sur lequel apparaissent bientôt des « bourgeons » qui engendrent autant de nouveaux axes feuillés.

1. Le rhizome d'une fougère, le Polypode

Mots clés

Rhizome, cordon vasculaire, trachéides scalariformes.

Principe

Le Polypode est une fougère (Ptéridophytes filicinées) commune sur les vieux murs, sur les rochers, aussi bien en plaine qu'en montagne *(fig. 34.1)*.

Il est reconnaissable à ses feuilles (ou frondes) chlorophylliennes de 20 à 30 cm de hauteur, découpées en lobes simples jusqu'à la nervure principale (ou rachis).

Sa tige souterraine ou rhizome, peu enracinée, est brunâtre, noduleuse, charnue, courant pratiquement à la surface du sol. Elle représente la partie vivace du végétal ; d'ailleurs, le polypode s'avère résistant aussi bien aux gelées qu'aux périodes de grande sécheresse.

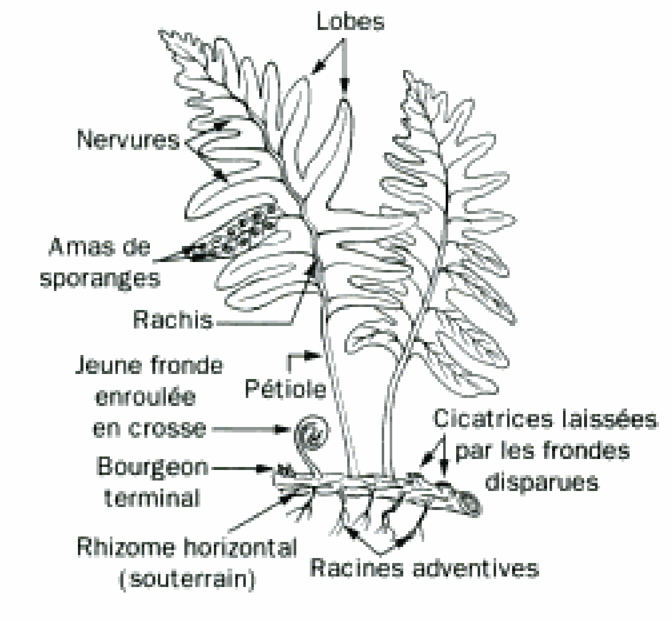


Figure 34.1. Le Polypode : appareil végétatif.

Sécurité

Cette manipulation ne présente aucun danger.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

Echantillons de Polypodes entiers frais (ou de rhizomes conservés dans l'alcool).

■ ***Réactifs***

– Solution d'eau iodée.
– Eau glycérinée.
– Ceux de la technique de double coloration (voir IV.21.7).

■ ***Matériel***

– Microscope.
– Lame de rasoir.
– Moelle de sureau en bâtons.
– Pinces fines.
– Verres de montre.
– Lames et lamelles.

Mode opératoire

Pratiquer une série de coupes aussi minces que possible et bien perpendiculaires au rhizome sectionné ; des coupes même partielles sont à conserver car, étant fines, elles se vident plus facilement de leur contenu. Le rhizome de Polypode est en effet riche en amidon et le passage à l'hypochlorite doit être assez long. A ce sujet, il est conseillé d'effectuer deux bains successifs dans l'hypochlorite, de 10 minutes chacun, entrecoupés par un lavage à l'eau.

Dans la foulée, prévoir quelques coupes longitudinales même partielles, elles aussi traitées par la double coloration en vue d'un examen des tissus conducteurs.
Observer successivement au faible puis au fort grossissement. Dessiner.

Résultats, observations et interprétation

La coupe transversale débute, en périphérie, par l'épiderme chez un jeune rhizome, remplacé plus tard par quelques couches de cellules imprégnées de lignine *(fig. 34.2)*.
L'épiderme entoure le parenchyme fondamental qui occupe toute la préparation. Il s'agit d'un parenchyme homogène à grandes cellules à parois cellulosiques assez épaisses.
Remarque : malgré les bains à l'hypochlorite, des secteurs de la coupe restent blanchâtres car ils contiennent encore des amyloplastes. Un lavage à l'alcool, après coloration, peut les éclaircir.

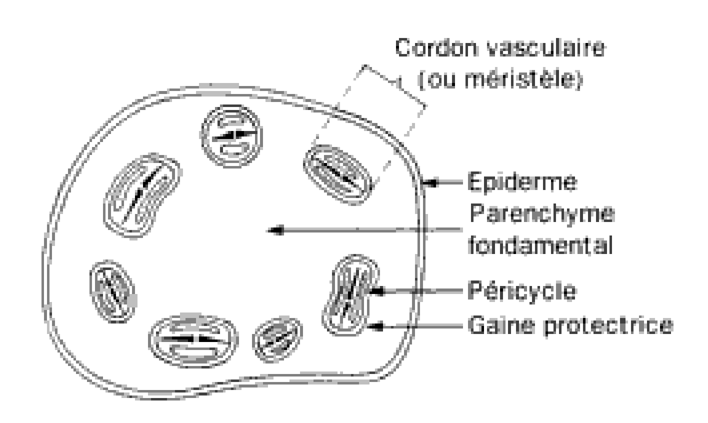


Figure 34.2. Anatomie du rhizome (structure polystélique).

Dans le parenchyme fondamental, apparaissent des cordons vasculaires (ou méristèles), disposés pratiquement sur un cercle.
Chaque cordon *(fig. 34.3)* est entouré d'une gaine protectrice plus ou moins lignifiée dans laquelle s'aperçoivent des canalicules d'échanges au travers desquels les oses, véhiculés par le phloème avec la sève élaborée, se polymérisent en amidon dans le parenchyme fondamental.
Un cordon vasculaire comporte deux massifs de xylème (centripète) alternant avec deux massifs de phloème ; ces derniers sont séparés des précédents par quelques rangées de parenchyme amylifère.
Après un schéma général de la coupe du rhizome, faire la mise en page d'un cordon vasculaire aussi simple que possible.
Au fort grossissement, commencer toujours le dessin de détail du cordon vasculaire par les éléments ligneux conducteurs et, pour ceux-ci, par les lamelles moyennes. De chaque côté des deux massifs de xylème, les deux zones parenchymateuses sont souvent mal vidées et apparaissent jaunâtres.

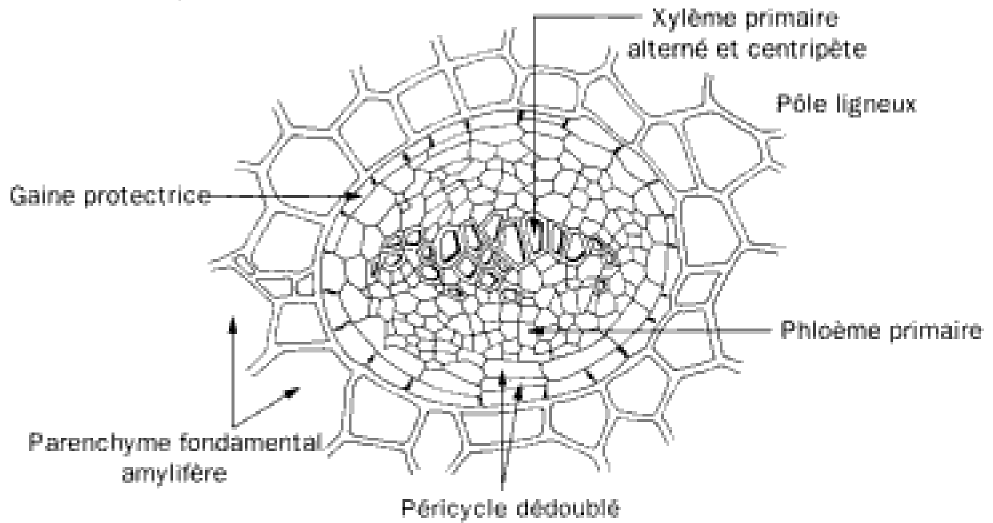


Figure 34.3. Organisation d'un cordon vasculaire (x 300).

Choisir d'abord un sporange mûr vidé de son contenu, puis un autre sporange mûr également, mais encore plein, et les examiner successivement.
Faire un second montage avec des sporanges jeunes prélevés au niveau de sores encore verts. Faire un dessin annoté.
Enfin, centrer la préparation sur une spore et en faire l'observation au fort grossissement du microscope (objectif 10 ou plus). Dessiner ensuite.

Résultats, observations et interprétation

Le sporange mûr possède un pédoncule formé d'une série linéaire de cellules et une paroi unistratifiée, c'est-à-dire à une seule couche de cellules. De plus, la paroi porte en position méridienne une rangée de cellules plus sombres dont les parois latérales et profonde portent des épaississements de lignine, puis de subérine. Seule, la paroi externe demeure mince et cellulosique. Cet ensemble de cellules épaissies forme l'anneau mécanique.
L'examen comparatif d'un jeune sporange verdâtre *(fig. 34.6)* montre que la paroi comporte encore des cellules vivantes car la lignine ne s'est pas encore installée dans les parois des cellules de l'anneau mécanique. En dessous, existent les cellules nourricières du tapis dont l'existence n'est que transitoire (leur contenu fournit les réserves des futures spores).

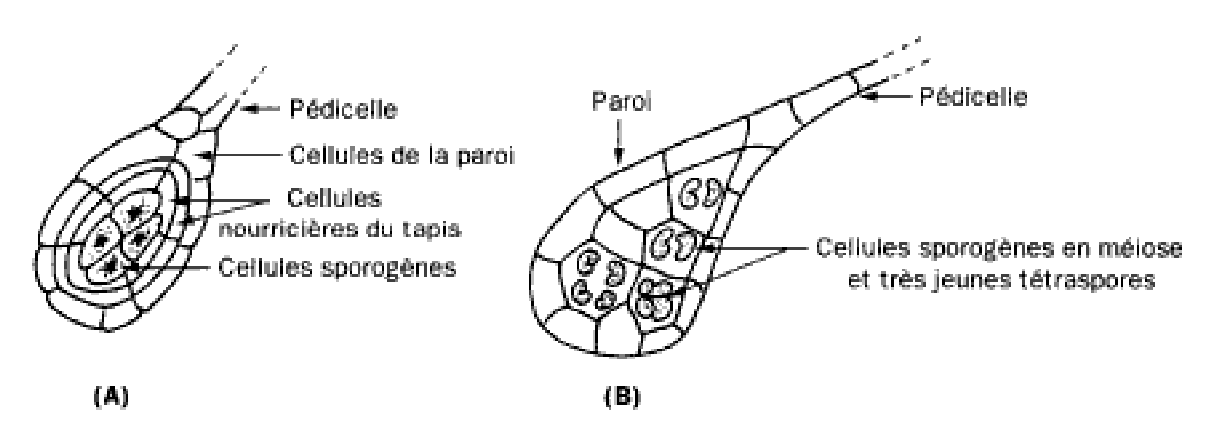


Figure 34.6.
Organisation d'un très jeune sporange.
(A) Schéma théorique.
(B) Observation (× 200).

Le centre du jeune sporange est par ailleurs occupé par une masse de 16 cellules sporogènes diploïdes (à 2n chromosomes). Chacune subit une méiose et l'ensemble engendre 64 spores haploïdes (à n chromosomes) qui s'entourent d'une paroi épaisse et imperméable, se déshydratent et passent ainsi en vie ralentie.
Pendant cette maturation des spores, la déshydratation affecte le reste du sporange, en particulier les cellules de l'anneau mécanique. Ces cellules « mécaniques » se dessèchent : leur paroi externe mince et cellulosique se « raccourcit » davantage que les parois profonde et latérales épaissies. En conséquence, la file de ces cellules tend à se redresser, une rupture se produit dans la zone de cellules pariétales restées cellulosiques entre l'anneau mécanique et le pédoncule *(fig. 34.7)*.
La rupture est brutale et l'anneau mécanique se recourbe en S. L'enveloppe du sporange se déchire donc et les spores libérées se trouvent projetées dans le milieu extérieur aérien.

• *Prélèvement des spores et ensemencement*

Prélever sur un sore de sporanges, à l'aide d'une pince fine, quelques sporanges. Les déposer sur une lame de verre et observer à la loupe binoculaire ou au faible grossissement d'un microscope.

A l'aide d'une aiguille lancéolée ou d'un scalpel, déchirer les sporanges. Une généreuse quantité de spores se répand sur la lame. Eliminer les sporanges « vides » à l'aide de l'aiguille les faisant glisser vers le bord de la lame-support.

Recommencer plusieurs fois cette manipulation de façon à obtenir un « tapis » de poussière de spores.

Passer ensuite un cheveu sur la lame couverte de spores : les spores se collent sur le cheveu, par électrostatisme semble-t-il. Le cheveu couvert de spores est alors glissé à la surface du milieu de culture : la répartition des spores ensemencées est ainsi beaucoup plus homogène.

• *Déroulement de la culture*

Le milieu de culture, la tourbe le plus souvent, est régulièrement arrosé avec du liquide de Knop.

Le couvercle de la boîte de Petri, mis en place, permet de maintenir humide l'atmosphère ambiante de la culture. En effet, la déshydratation est très préjudiciable aux prothalles et aux jeunes fougères. Par contre, l'excès de liquide doit être éliminé.

Les algues vertes ou les mousses installées éventuellement sur la tourbe doivent être arrachées au fur et à mesure de leur croissance.

Cette culture placée en lumière diffuse verdit au bout de quelques semaines.

A la loupe binoculaire ou au microscope, par prélèvements successifs, suivre régulièrement l'évolution de cette culture de prothalles. Observer progressivement l'apparition d'un « protonéma filamenteux » dont l'extrémité s'élargit bientôt en un prothalle cordiforme *(fig. 34.9)*.

On peut ainsi obtenir des prothalles de quelques millimètres à un centimètre de diamètre.

La position des prothalles est originale : ils sont orientés obliquement par rapport à la surface du substrat. Chaque prothalle ne repose que sur sa pointe (c'est-à-dire l'emplacement de la spore d'origine). Les rhizoïdes dressés verticalement assurent, à la manière de béquilles, le contact avec le substrat.

Chez les prothalles âgés, l'aspect cordiforme s'estompe.

En général, beaucoup de prothalles ainsi cultivés donnent naissance à de petites fougères, donc issues d'une fécondation.

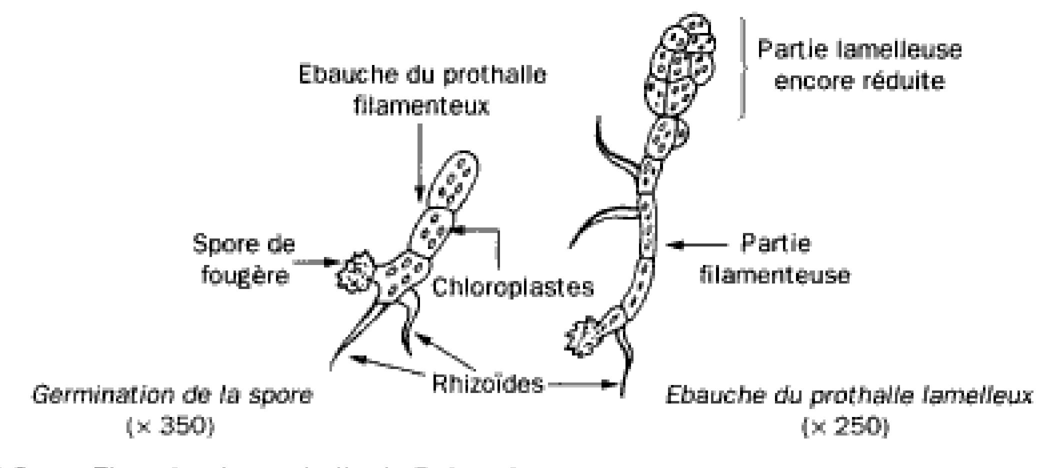


Figure 34.9. Ebauche du prothalle de Polypode.

Eclaircir périodiquement la culture (et procéder à d'éventuels repiquages) car la densité des prothalles risque d'être trop forte.

Il faut 3 mois environ pour obtenir le stade des prothalles cordiformes.

Aussi ce type de culture nécessite-t-elle la durée, car il faut encore pratiquement 1 an pour observer de petites fougères de 2 cm de hauteur.

■ ***Examen des prothalles***

Le prothalle présente, au cours de son existence, deux périodes intéressantes à étudier :

– la première pendant laquelle il porte les organes sexuels d'abord mâles (ou anthéridies), puis femelles (ou archégones), ces derniers vers l'échancrure ;
– la seconde pendant laquelle, la fécondation ayant eu lieu, l'embryon se transforme en une jeune fougère, au sein du prothalle qui se comporte alors comme une source de nourriture pour l'embryon.

Prélever, à l'aide de pinces fines, des prothalles récoltés dans la nature ou extraits d'une culture. En placer un ou deux exemplaires dans une goutte d'eau glycérinée entre lame et lamelle. Porter la préparation sur la platine du microscope et examiner le minuscule prothalle chlorophyllien, au faible grossissement.

A partir d'une culture âgée ou de prothalles évolués recueillis dans la nature, prélever une série de prothalles portant de jeunes fougères à une, deux, trois, etc. frondes. Dans ce but, vérifier au préalable l'organisation des échantillons à la loupe binoculaire avant de passer au faible grossissement du microscope.

Résultats, observations et interprétation

■ ***Le prothalle jeune et les organes sexuels***

A la loupe binoculaire, le jeune prothalle est échancré en forme de cœur *(fig. 34.10)* ; sa face inférieure proche du substrat porte en son centre des filaments ou rhizoïdes.

Au microscope, l'organisation du prothalle se précise.

Sur les bords, une seule assise de cellules ; au centre, à proximité de l'échancrure, le coussinet à plusieurs couches cellulaires est plus épais ; les rhizoïdes sont formés d'une file de cellules (vides et brunes s'ils sont sénescents).

Des taches sombres indiquent l'emplacement des organes sexuels.

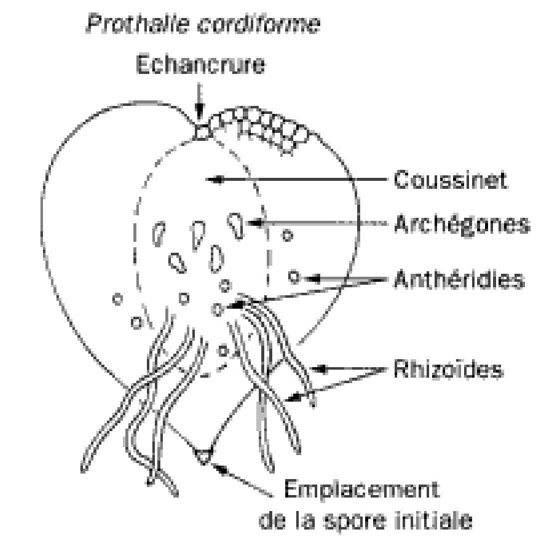


Figure 34.10. Le prothalle de Polypode (× 10).

Les organes mâles (ou anthéridies), souvent nombreux, occupent les bords du prothalle de chaque côté de l'échancrure ou bien la partie ancienne proche de la spore d'origine. Ce sont de petits sacs globuleux *(fig. 34.11)* libérant à maturité des spermatozoïdes flagellés *(fig. 34.12B)*.

Les organes femelles (ou archégones) se situent sur le coussinet près de l'échancrure. Observer les orifices des cols des archégones *(fig. 34.13)* car il s'agit d'organes sexuels en forme de petites bouteilles à goulot étroit dont le ventre enfoui dans le coussinet contient un volumineux gamète femelle ou oosphère.

La fécondation est très difficile à observer. Elle n'est possible que si la face inférieure du prothalle est suffisamment humide (pluie ou rosée dans la nature ou arrosage au laboratoire).

Alors, les spermatozoïdes mobiles, échappés des anthéridies par éclatement de leur paroi *(fig. 34.12A)*, nagent en direction des cols des archégones *(fig. 34.14)*. Ce mouvement traduit un chimiotactisme positif exercé sur les spermatozoïdes par les archégones qui produisent à cet effet une substance attractive, en l'occurrence de l'acide malique.

Un spermatozoïde s'unit à une oosphère et cette fécondation conduit à l'obtention d'une cellule-œuf ou zygote diploïde (à 2n chromosomes).

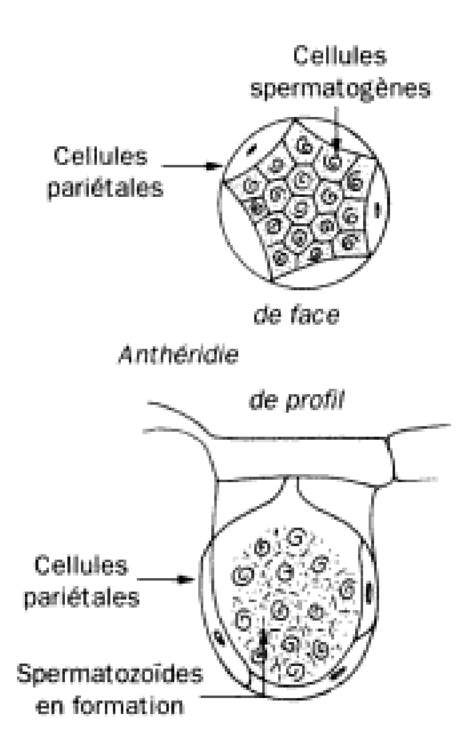


Figure 34.11. L'anthéridie du prothalle de Polypode (× 500).

■ ***Le prothalle âgé et la jeune fougère***

Le zygote, utilisant en parasite les matériaux photosynthétisés par le prothalle vert, se segmente aussitôt en un embryon qui évolue d'abord en un jeune individu formé d'une première feuille bilobée et d'une première racine *(fig. 34.15)*.

Une zone embryonnaire située à proximité produit à son tour une seconde feuille de surface plus grande que la première et une seconde racine.

Remarque : observer que la ramification par bipartitions successives (dichotomie) affecte les nervures foliaires tout comme les racines.

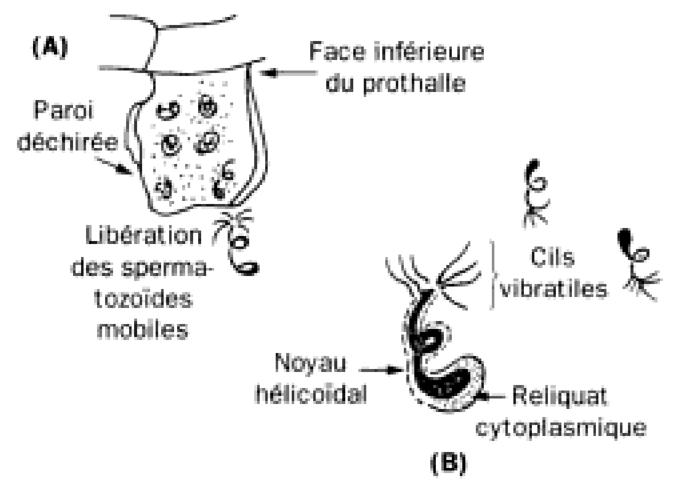


Figure 34.12. Mise en liberté des spermatozoïdes.
(A) Déchirure de l'anthéridie (× 500).
(B) Spermatozoïdes « libres » (× 1 200).

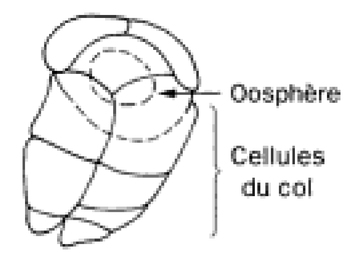


Figure 34.13. Jeune archégone de Polypode (× 500).

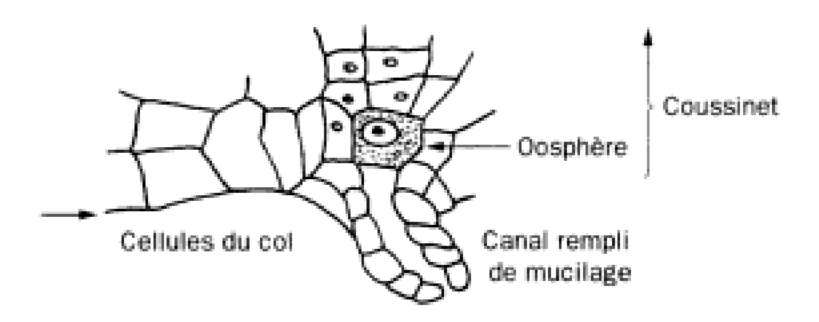


Figure 34.14. Organisation d'un archégone parvenu à maturité (× 650).



Les Gymnospermes

Sommaire

Page

1. Le bois des Gymnospermes

Mots clés

Trachéides aréolées, bois de printemps, bois d'automne, rayons ligneux médullaires, conifère.

Principe

Les Gymnospermes rassemblent des arbustes et des arbres souvent de grande taille qui développent, à l'occasion de la croissance en épaisseur de leurs organes végétatifs (tiges et racines surtout), des tissus conducteurs secondaires dont le xylème secondaire ou bois est le plus représentatif.
Son étude permet de mieux comprendre ce qui l'oppose à celui des Angiospermes.

Sécurité

Cette manipulation ne présente aucun danger.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***
– Echantillon de tige de conifère de 3 ou 4 ans.
– Fragment de planche de pin, d'épicea.

■ ***Réactifs***
– Ceux de la double coloration (voir IV.21.7).
– Eau iodée.

■ ***Matériel***
– Microscope.
– Matériel de la technique de la double coloration (voir IV.21.7).
– Lames et lamelles.
– Lame de rasoir.

Mode opératoire

Appliquer à l'échantillon, prélevé sur une jeune branche de conifère, la technique des coupes transversales et longitudinales présentée à propos des tissus de la Bryone.
A partir d'une planche de pin, de sapin, etc., extraire un petit parallélipipède de bois à l'aide d'une scie *(fig. 35.1)*.
Sur la section transversale (la plus petite) de l'échantillon, observer les stries concentriques de croissance *(fig. 35.2)* délimitant les cernes annuels, élaborés par l'assise libéro-ligneuse (ou cambium), cycliquement, à chaque période de végétation active (printemps et été).
Ces stries facilitent l'orientation de l'échantillon, indispensable à connaître.

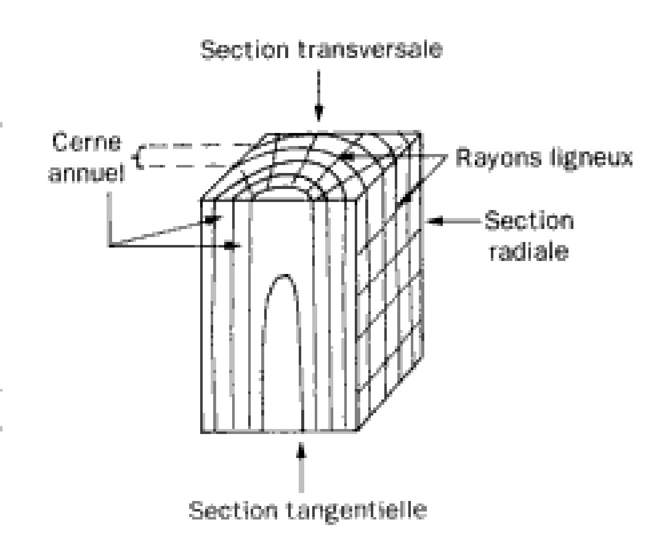


Figure 35.1. Diverses sections d'un bloc rectangulaire taillé dans du bois de pin.

■ ***Observation d'une coupe longitudinale tangentielle***

On retrouve les mêmes constituants : les rayons médullaires, qui offrent une section lenticulaire et présentent une différenciation en :

– éléments à parois épaisses vers les « pointes » de la lentille ;
– éléments à parois minces dans la zone moyenne. Une coupe non vidée de son contenu par l'hypochlorite de sodium et montée dans un réactif iodé révèle la présence, dans ces structures cellulaires à parois minces, de nombreux grains d'amidon (forme de réserves pour le végétal) *(fig. 35.5)*.

Sur les parois des trachéides, les ponctuations aréolées ont le même aspect que sur les coupes transversales.

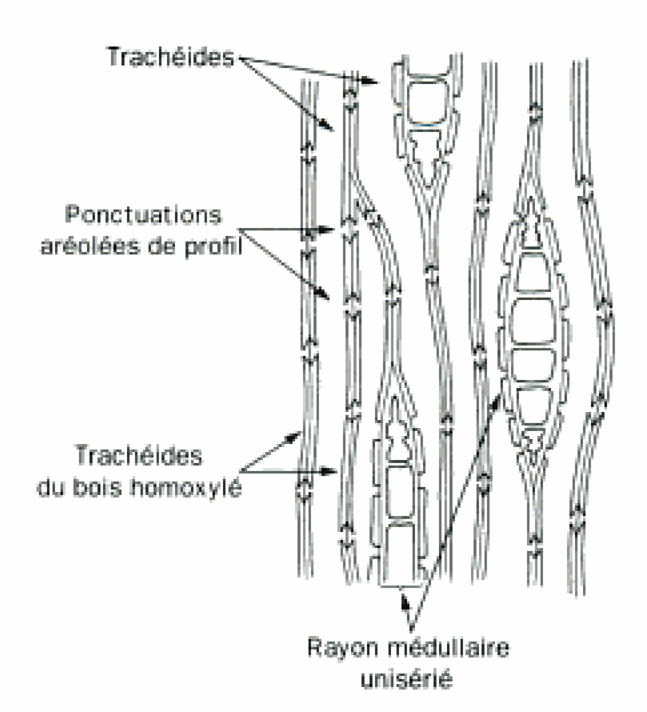


Figure 35.5. Coupe longitudinale tangentielle dans une tige de pin (Conifères) (× 600).

■ ***Observation d'une coupe longitudinale radiale***

Elle présente un autre aspect de ces mêmes trachéides ; celles-ci se terminent en biseau moins accentué que sur la coupe longitudinale tangentielle *(fig. 35.6)*.

Elle permet de vérifier la disposition des ponctuations et l'épaisseur réduite des rayons ligneux unistratifiés à rôle de réserve. On constate ainsi l'absence de ponctuations aréolées sur les parois sectionnées. Toutes apparaissent dans le plan de la préparation.

Les rayons médullaires étalés eux aussi dans ce même plan vérifient les caractéristiques fournies par les coupes précédentes, tant dans les formes que dans les dimensions des cellules concernées.

Remarque : les diverses sortes de coupes pratiquées précisent l'existence de canaux à résine qui apparaissent chacun comme une lacune ponctuelle dans le bois, les cellules sécrétrices étant déjà résorbées.

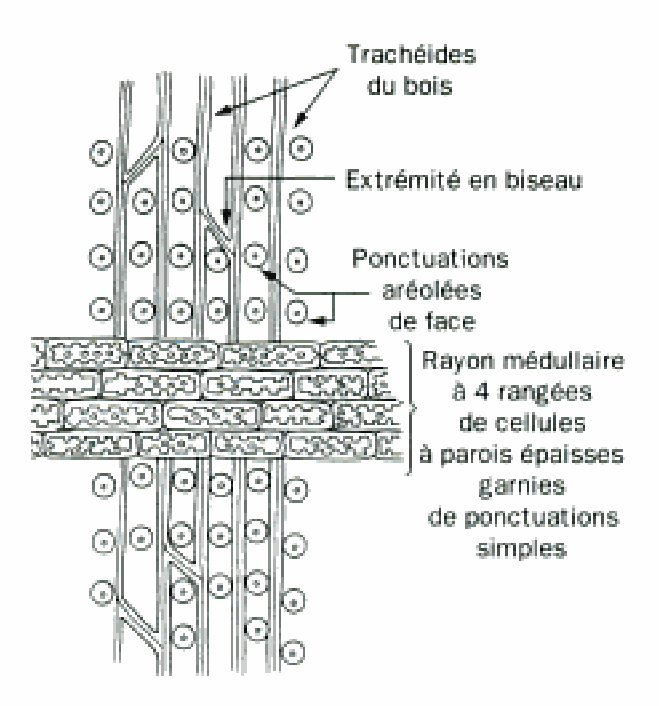


Figure 35.6. Coupe longitudinale radiale dans une tige de pin (Conifères) (× 600).

Conclusion

Le bois homoxylé des Gymnospermes est considéré comme plus primitif que celui qualifié de hétéroxylé des Angiospermes qui a valeur de complexe tissulaire avec des éléments conducteurs diversifiés (vaisseaux rayés, réticulés et ponctués) et des éléments de soutien (les fibres ligneuses) accompagnant du parenchyme ligneux de réserves.

L'aiguille étant persistante, les formations conductrices secondaires ne sont pas négligeables *(fig. 35.8D)*.
Ces deux faisceaux conducteurs sont entourés par le « tissu de transfusion », fait de cellules parenchymateuses vivantes à parois cellulosiques et de cellules mortes à parois lignifiées présentant des ponctuations aréolées semblables à celles des éléments conducteurs du xylème qui les mettent en communication les unes avec les autres.

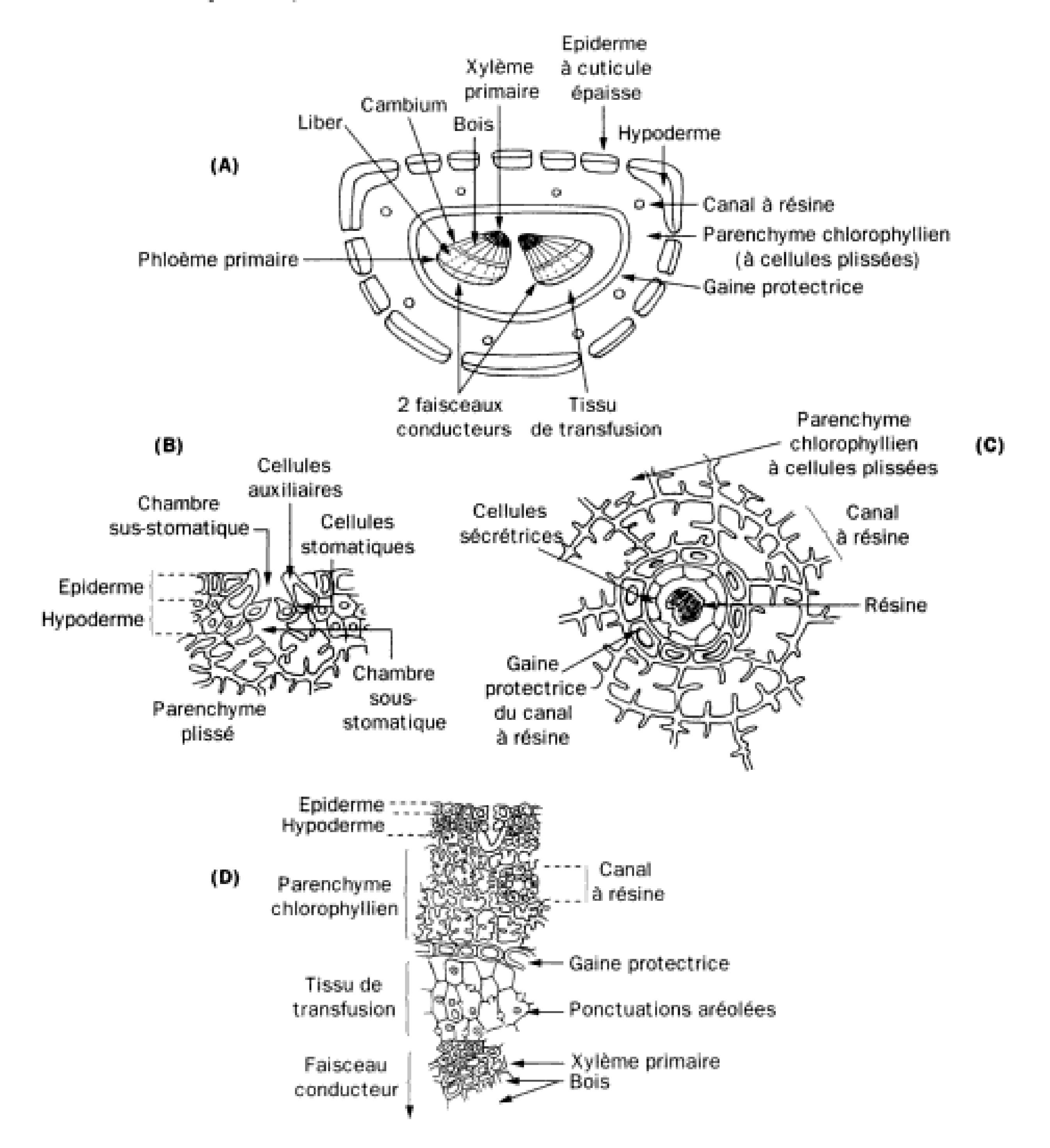


Figure 35.8. Anatomie de l'aiguille de pin (Abiétinées).
(A) Schéma d'ensemble (× 100).
(B) Détail d'un stomate (× 450).
(C) Détail d'un canal de résine (× 700).
(D) Dessin de détail (× 200).

Ce tissu original peut être interprété soit comme un tissu conducteur auxiliaire du xylème, soit comme un tissu de réserve aquifère.
Une gaine protectrice sclérifiée faite de cellules à parois épaisses sépare le « tissu de transfusion » du parenchyme chlorophyllien plissé.

Conclusion

Chez le pin par exemple, la faible surface foliaire exposée au soleil (due à la forme en aiguille), l'épaisse cuticule, les stomates enfoncés, le « tissu de transfusion », etc. sont autant d'éléments expliquant l'adaptation des Conifères aux milieux « secs » : ces végétaux font partie des Xérophytes.



Les Angiospermes

Sommaire

1. Confection d'un herbier de Végétaux supérieurs

Mots clés

Herbier, nom de famille.

Principe

Dans la nature, l'étude des végétaux, en particulier des Phanérogames (Conifères et Angiospermes) ou plantes à fleurs, n'est pas toujours facile et est souvent limitée dans le temps. Aussi, convient-il de pouvoir conserver, par delà leur récolte lors d'excursions botaniques, certains échantillons dont on souhaite étudier dans le calme (chez soi ou au laboratoire) les grands traits caractéristiques des familles auxquelles ils appartiennent.

Un herbier est une collection de végétaux séchés, déterminés et classés par familles, représentant la flore d'une région donnée, celle que l'on habite, par exemple.

La confection d'un herbier est une occupation profitable et loin d'être désagréable !

La récolte des échantillons est une saine distraction : c'est un motif de promenade et souvent un exercice physique lorsque les plantes poussent dans des endroits d'accès difficile !

La détermination des échantillons récoltés exige une observation minutieuse : c'est à chaque fois une énigme à résoudre.

La préparation des plantes, le séchage et la mise en page développent l'habileté manuelle et le sens artistique et apprennent à bien présenter un ouvrage.

Le classement des végétaux par familles développe les qualités d'ordre et de méthode.

Enfin, une herborisation attentive fait mieux connaître la foule des végétaux rassemblés autour de nous.

Sécurité

Cette manipulation ne présente aucun danger.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

Les végétaux récoltés à l'occasion d'une sortie de botanique.

■ ***Matériel***

• *Sur le terrain*

Se munir d'une boîte métallique pour botaniste ou bien de boîtes en plastique rigide pour le transport des échantillons, de crayons et de feuilles de papier brouillon (format 20 × 15 cm) fendues en leur centre pour y glisser l'échantillon récolté et identifié à l'aide d'une flore, à transporter également ainsi qu'une carte détaillée de la région visitée.

De bonnes chaussures de marche, un vêtement de pluie, un sac à dos ou similaire complètent l'équipement.

• *Au laboratoire (ou à la maison)*

Préparer des récipients remplis d'eau (au retour de l'excursion), une presse, de vieux journaux ou autre matériau absorbant, des feuilles de papier blanc ou jaune (papier bulle), un ruban de papier adhésif, des ciseaux, des étiquettes pour herbier, une flore.

Prévoir ultérieurement du pentachlorophénol pour la protection de l'herbier confectionné vis-à-vis des insectes.

Mode opératoire

■ ***La préparation des échantillons***

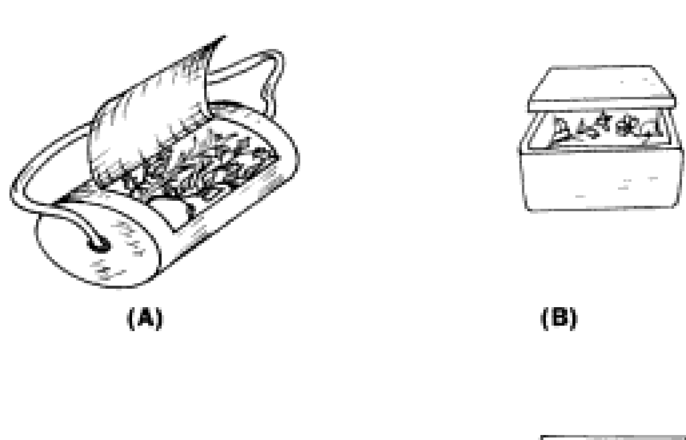
Au cours d'une excursion, récolter les spécimens qui vous semblent dignes d'intérêt.
Les cueillir aussi complets que possible avec les racines, tiges feuillées, fleurs, fruits et graines. Il est bon de les déterrer en prenant les racines ou les rhizomes.
Cependant, il est aisé d'identifier les rameaux feuillés d'arbustes et d'arbres, sans en posséder les fleurs !
S'il s'agit d'un herbier d'organes végétaux, ceux-ci sont choisis pour montrer les particularités originales qu'ils possèdent. Dans le cas des arbres et arbustes, conserver les feuilles et les fruits associés.
Au début, il convient d'être modeste : limiter sa récolte à un petit nombre d'échantillons aux fleurs bien visibles et caractéristiques.
Les végétaux sont fragiles et doivent donc être cueillis et transportés avec beaucoup de soin, car ils souffrent d'être entassés dans un sac mal aéré et surchauffé.
On peut utiliser dans ce but soit une boîte métallique d'herboriste *(fig. 36.1A)*, soit un simple sac de toile garni d'un peu d'herbe, que l'on évite de laisser au soleil par crainte de fanaison des spécimens récoltés.
Prévoir éventuellement une série de boîtes en plastique rigide encastrables de taille moyenne *(fig. 36.1B)* pouvant être aisément transportées dans un sac à dos.
Ne pas laisser se dessécher les échantillons et s'en occuper dès le retour de l'herborisation : si l'on ne trouve pas immédiatement le temps de les mettre sous presse, au moins les rincer un à un dans de l'eau (pour enlever les insectes et autres bestioles), puis les tamponner avec un linge doux, couper l'extrémité des tiges et les placer dans des vases remplis d'eau.
Ne pas récolter de plantes mouillées par la pluie ; elles sèchent mal et moisissent.

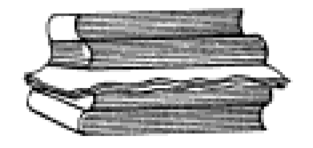
■ ***La détermination***

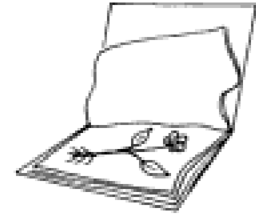
On détermine les végétaux récoltés avant de les sécher sous presse car l'opération devient beaucoup trop difficile et incertaine par la suite.
Une première détermination rapide et approximative peut parfois faire appel à des gravures et des planches d'ouvrages de vulgarisation, mais une détermination scientifique précise exige l'usage d'une flore.

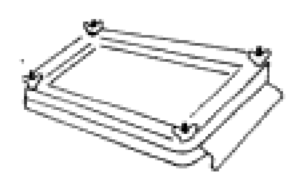
■ ***Le séchage***

La « presse à fleurs » permet de conserver des fleurs, mais aussi des feuilles, des petits rameaux et même des racines !
Plus la dessiccation est rapide, mieux se conservent les couleurs ; cependant un certain rétrécissement et un gauchissement s'avèrent inévitables.
Une presse *(fig. 36.1C)* peut être un ancien protège-raquette de tennis en bois de forme trapèze et orné d'écrous de serrage, ou bien un carton à dessins ceinturé d'un fort bracelet élastique ou d'une courroie réglable en étoffe, ou tout simplement de gros ouvrages lourds ou des annuaires !
Le principe de base est de placer les échantillons entre des couches de papier absorbant, d'exercer une certaine pression et de laisser sécher *(fig. 36.1D)*.
On utilise à cet effet soit des feuilles de vieux journaux, soit un papier buvard gris vendu spécialement à cet usage.
Dans un local sec et aéré, on dispose dans la presse quelques feuilles de journal, un échantillon, quelques feuilles de journal, un autre échantillon et ainsi de suite...











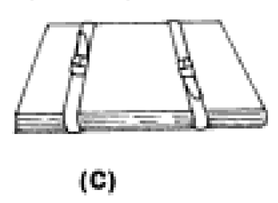
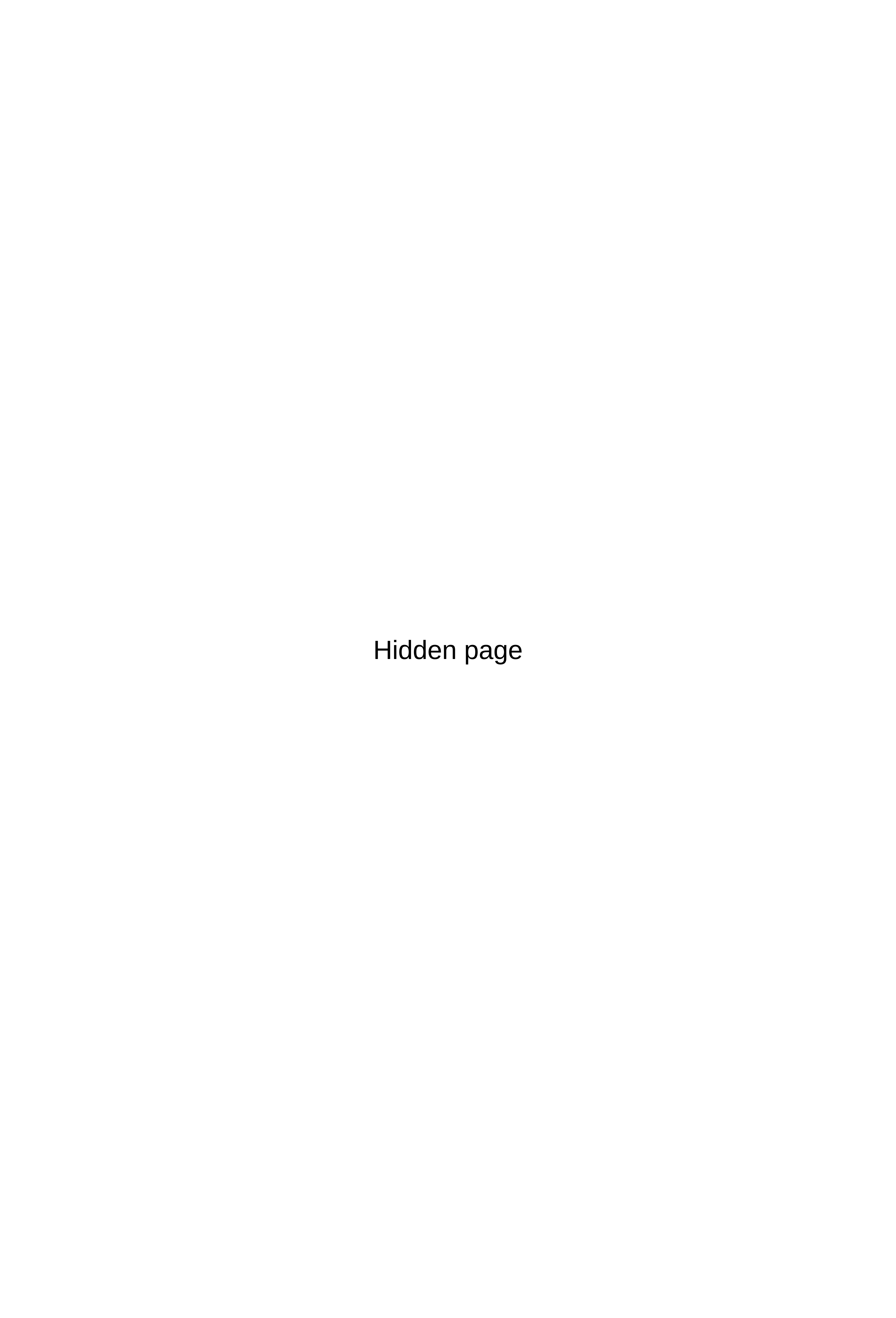


Figure 36.1. Confection d'un herbier de Végétaux supérieurs.
(A) Boîte métallique de botaniste.
(B) Boîte en plastique rigide.
(C) Les systèmes de presse.
(D) Technique du séchage.

A défaut de presse, placer une planche (à dessin) ou un assemblage rigide de planches sur les dernières feuilles de journaux, à surcharger de quelques gros annuaires. Il est inutile que cette charge soit considérable.
Il est préférable de s'exercer avec des plantes communes afin d'acquérir une bonne pratique avant de collectionner sérieusement.


Hidden page

2. Compléter cette série d'expériences par une autre série utilisant un indicateur coloré d'oxydoréduction pour la mise en évidence du dioxygène.

Pour le préparer, diluer une pointe de spatule de dichlorophénolindophénol dans une éprouvette contenant de l'eau distillée jusqu'à obtention d'une couleur bleu clair (sinon diluer plus et filtrer). Ajouter à cette solution une solution saturée d'hydrosulfite de sodium (sodium dithionite) goutte à goutte, en remuant à chaque fois, jusqu'à décoloration complète. Attendre 1 minute. Si la solution se recolore, ajouter une goutte d'hydrosulfite de sodium.

Verser un volume de l'indicateur dans une série de sept tubes à essais disposés sur un râtelier dans une boîte et contenant chacun et respectivement le même volume d'eau distillée, d'eau du robinet à différentes températures et d'eau additionnée d'hydrogénocarbonate de sodium à 1 %. Boucher les tubes avec du parafilm. Fermer le couvercle de la boîte et laisser à l'obscurité. Sortir le râtelier de tubes à essais. Constater qu'il n'y a pas de changement de coloration notable. Éclairer avec la lampe. Constater qu'il n'y a pas de changement de coloration notable. Renouveler ces deux expériences (à l'obscurité puis à la lumière) en introduisant dans chaque tube à essai une tige feuillue d'Elodée de même longueur. Observer l'apparition d'une coloration bleue dans les tubes à essais éclairés (signalant l'oxydation de l'indicateur réduit par le dioxygène libéré par la plante verte) d'autant plus marquée et rapide à se manifester que le tube à essai contient de l'hydrogénocarbonate de sodium ou de l'eau tiède.

Résultats, observations et interprétation

A la lumière, les feuilles d'Elodée produisent du dioxygène qui diffuse préférentiellement vers la lacune centrale de la tige remplie d'air car la solubilité y est meilleure que dans l'eau. La pression n'étant pas modifiée dans cette lacune par le sectionnement de la tige, toute la production de dioxygène se traduit par une sortie immédiate sous forme gazeuse au niveau de la section. Cette production de dioxygène dépend de l'intensité de l'éclairement, de la température et de la concentration en dioxyde de carbone. Ce processus est une des manifestations d'une activité métabolique spécifique des plantes chlorophylliennes appelée photosynthèse.

3. Mise en évidence de la montée de la sève brute chez les plantes

Mots clés

Circulation de la sève, végétaux, physiologie.

Sécurité

Aucun risque lié à l'expérience proprement dite.

Principe

A l'aide de différentes plantes usuelles et d'encre, montrer la montée de l'eau par capillarité dans les vaisseaux conducteurs de sève.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

Branche de céleri, tige fleurie d'œillet blanc ou de marguerite blanche.

■ ***Matériel***

– Encres rouge et bleue.
– Trois verres.
– Un cutter.

Mode opératoire

Plonger la base d'une tige de céleri, sectionnée proprement, dans un verre au tiers plein d'encre rouge pure *(fig. 36.3)*.

Au bout de 1 ou 2 heures, observer aisément par transparence des lignes colorées en rouge matérialisant les vaisseaux conducteurs depuis la base de la tige jusqu'aux feuilles. En sectionnant à mi-hauteur la tige, on observera en coupe la disposition des vaisseaux conducteurs.

Après avoir mesuré le degré hygrométrique de l'air et plongé une nouvelle tige dans l'encre, on pourra mesurer toutes les demi-heures la longueur des vaisseaux colorés et calculer la vitesse de progression de la sève.

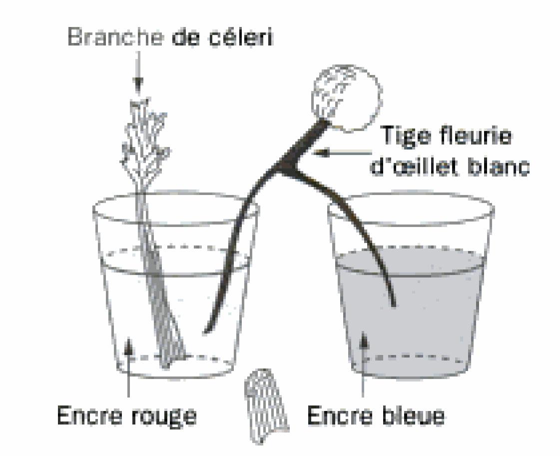


Figure 36.3. La montée de sève brute chez les végétaux.

Le même type de mesure pourra être effectué sur une autre tige de céleri en disposant à côté des feuilles un sèche-cheveux. Constater une accélération de la vitesse de progression de la sève causée par un accroissement de la transpiration.

Une variante de cette expérience peut être réalisée sur une tige fleurie d'œillet ou de marguerite que l'on aura fendue en deux. Une moitié de la base de la tige sera plongée dans un verre d'encre bleue et l'autre moitié dans un verre d'encre rouge. Au bout de quelques heures, la moitié des pétales seront teintés légèrement de bleu et l'autre moitié de rouge.

Résultats, observations et interprétation

L'eau monte dans les tiges, attirée par capillarité sur les parties lignifiées des vaisseaux conducteurs de sève.



4. La transpiration chez les végétaux

Mots clés

Transpiration, végétaux, circulation de l'eau, physiologie.

Principe

A l'aide d'un rameau feuillé, mettre en évidence le débit d'eau transpirée par une plante, l'influence de la ventilation sur celui-ci et les organes de transpiration.

Sécurité

Le chlorure de cobalt est un composé nocif, placé dans la classe 3 de la classification toxicologique helvétique (poison puissant). La solution de chlorure de cobalt ne doit, en aucun cas, être pipetée à la bouche.

Matière d'œuvre

■ ***Matériel biologique***

Tiges feuillées fraîchement coupées d'arbre (exemple : platane), de plante d'appartement ou de fleur (exemple : marguerite) ou de légume (exemple : poireau) de votre choix.

■ ***Réactifs***

Solution de chlorure de cobalt (à préparer comme il est indiqué dans le Mode opératoire).

■ ***Matériel***

– Six petites éprouvettes graduées.
– Un ventilateur ou un sèche-cheveux (avec position air froid).
– Un microscope grossissant au moins 100 fois.
– Une pince fine.
– Vaseline.
– Huile.
– Feuille de papier millimétré.
– Feuille de papier filtre fin.
– Ruban adhésif transparent.

Mode opératoire

Remplir d'eau les éprouvettes graduées jusqu'aux deux tiers, puis verser de l'huile pour former une couche surnageante de 2 mm d'épaisseur, empêchant l'évaporation de l'eau. Plonger au fond de chacune des deux premières éprouvettes respectivement une tige feuillée et une tige complètement effeuillée. Entourer les feuilles d'un sac transparent en plastique ligaturé sur la tige. Mesurer la perte d'eau dans les éprouvettes toutes les demi-heures. Constater qu'il n'y a pas de perte notable d'eau dans la deuxième éprouvette et que la surface interne du sac en plastique se couvre de buée *(fig. 36.4)*.

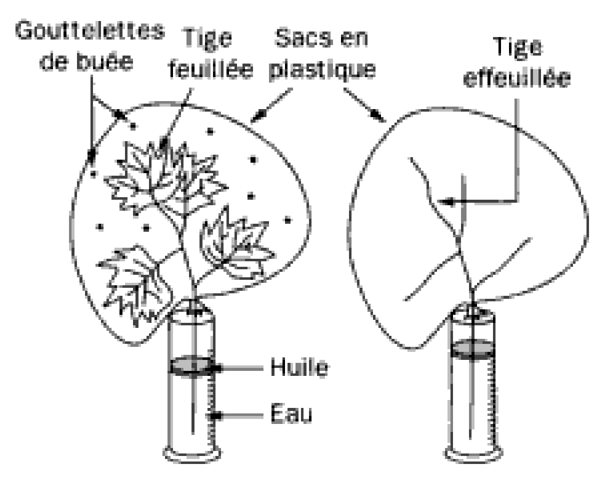


Figure 36.4. Mise en évidence de la transpiration chez les végétaux.

Plonger dans la troisième éprouvette une tige feuillée dont on a enduit de vaseline la surface supérieure de chaque feuille et dans la quatrième éprouvette une tige feuillée de même espèce dont on a recouvert de vaseline les surfaces foliaires inférieures. Mesurer les pertes d'eau toutes les demi-heures. Constater qu'il n'y a qu'une très faible perte d'eau dans la quatrième éprouvette.

En arrachant toutes les feuilles de la tige de la première éprouvette et en reportant leur silhouette sur le papier millimétré, on pourra calculer la surface des feuilles et déterminer le débit d'eau transpirée en $g/cm^2/h$. Plonger un rameau feuillé de même espèce sans l'entourer de sac en plastique en disposant à hauteur des feuilles un ventilateur en marche. Constater la baisse plus rapide du niveau d'eau dans l'éprouvette. Calculer le débit de transpiration. Comparer avec le cas précédent.

Préparer une solution de chlorure de cobalt (attention à ne pas manipuler à main nue et à ne pas ingérer), en dissolvant des cristaux dans de l'eau bouillante (concentration de l'ordre de 5 g/100 mL).

Lorsque la solution rose est refroidie, imbiber en une feuille de papier filtre. Laisser sécher la feuille sur un radiateur de chauffage central. Lorsque le papier est devenu uniformément bleu, découper des carrés de 1 cm de côté. Coller à l'aide du ruban adhésif ces carrés sur la surface supérieure et inférieure des feuilles d'un rameau fraîchement coupé de telle sorte que les papiers au cobalt n'aient aucun contact avec l'atmosphère *(fig. 36.5A)*.

Constater que les papiers bleus collés sur la surface inférieure en différents points redeviennent progressivement roses en se réhydratant au contact de l'eau transpirée.

Prélever à l'aide de la pince fine un mince lambeau d'épiderme de la face inférieure d'une feuille (sur une feuille de poireau, de bryophyllum ou de marguerite, ce prélèvement est plus aisée). Monter ce lambeau d'épiderme entre lame et lamelle dans une goutte d'eau et observer au microscope au grossissement 100. Les orifices de transpiration ou ostioles plus ou moins ouverts apparaissent entourés de structures en forme de grains de café : les stomates *(fig. 36.5B)*.

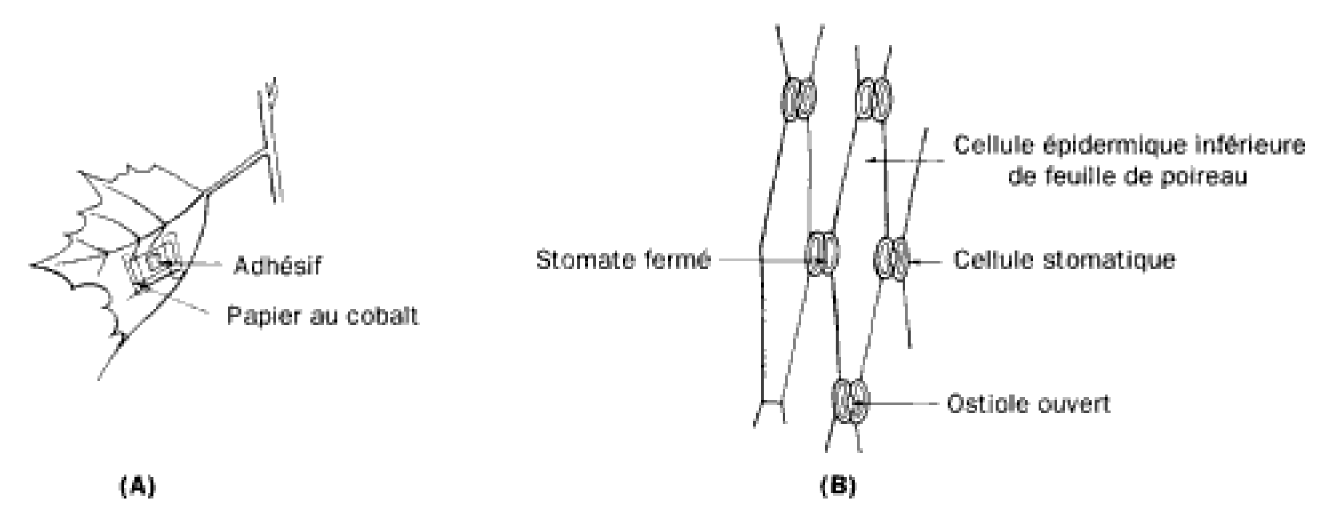


Figure 36.5. Les stomates.

Résultats, observations et interprétation

L'eau ayant circulé dans les vaisseaux conducteurs de sève est éliminée par transpiration. Cette transpiration s'effectue notamment au niveau de la surface inférieure les feuilles par les stomates et est activée par la ventilation.

Argent nitrate 0,05 mol/L	
(à diluer 5 fois avant utilisation)	Réf. MERCK : 1 11718 1000
Ammonium-fer (III) sulfate dodécahydraté	Réf. MERCK : 1 03776 0500
Ammonium thiocyanate 0,1 mol/L	
(à diluer 10 fois avant utilisation)	Réf. MERCK : 1 09900 0001
Matériel	
Fiole jaugée de 50 cm^3	Réf. PROLABO : 01 156 345
Fiole erlenmeyer de 250 cm^3	Réf. PROLABO : 09 024 070
Pipette jaugée 2 traits de 5 cm^3	Réf. PROLABO : 00 379 827
Pipette jaugée 2 traits de 10 cm^3	Réf. PROLABO : 00 379 838
Poire à pipeter, modèle universel	Réf. PROLABO : 08 343 601
Eprouvette de 10 cm^3	Réf. PROLABO : 09 015 216
Burette de 25 cm^3 graduée au 1/10	Réf. PROLABO : 01 005 297
Expérience I.1.4.1.	Page 12
Réactifs	
Ammonium heptamolybdate tétrahydraté	Réf. MERCK : 1 01180 0250
Ammonium monovanadate	Réf. MERCK : 1 01226 0100
Acide nitrique 65 % pour analyses	Réf. MERCK : 1 00456 1000
Matériel	
Tubes à hémolyse	Réf. PROLABO : 05 623 927
Tubes à essais	Réf. PROLABO : 00 883 922
Papiers-filtres blancs plissés	Réf. PROLABO : 08 322 712
Entonnoir diamètre 70 mm	Réf. PROLABO : 00 451 075
Compte-gouttes « Liquipettes », 2,5 ml	Réf. PROLABO : 01 146 660
Expérience I.1.4.2.	Page 13
Réactifs	
Ammonium heptamolybdate tétrahydraté	Réf. MERCK : 1 01180 0250
Acide sulfurique	Réf. MERCK : 1 00731 1000
Sodium sulfite	Réf. MERCK : 1 06657 0500
Hydroquinone	Réf. MERCK : 1 04610 1000
Di-potassium hydrogénophosphate	Réf. MERCK : 1 05104 1000
Matériel	
Fiole jaugée de 10 cm^3	Réf. PROLABO : 01 156 208
Pipette jaugée 2 traits de 1 cm^3	Réf. PROLABO : 00 379 805
Pipette jaugée 2 traits de 2 cm^3	Réf. PROLABO : 00 379 816
Pipette jaugée 2 traits de 5 cm^3	Réf. PROLABO : 00 379 827
Pipette jaugée 2 traits de 10 cm^3	Réf. PROLABO : 00 379 838
Poire à pipeter, modèle universel	Réf. PROLABO : 08 343 601
Eprouvette de 10 cm^3	Réf. PROLABO : 09 015 216
Spectrophotomètre	Réf. PROLABO : 05 525 906
	Réf. PROLABO : 05 525 917
Cuves spectro à usage unique	Réf. PROLABO : 05 928 908
Expérience I.1.5.1.	Page 16
Réactifs	
Acide chlorhydrique pur	Réf. MERCK : 1 00318
Ferrocyanure de potassium	Réf. MERCK : 1 04984
Matériel	
Mortier	Réf. PROLABO : 01 447 341

Pilon	Réf. PROLABO : 01 457 106
Sable de Fontainebleau	Réf. PROLABO : 27 460 364
Compte-gouttes	Réf. PROLABO : 01 146 751
Pipette de 2 cm^3	Réf. PROLABO : 00 469 065
Poire d'aspiration	Réf. PROLABO : 08 343 601
Tube à essais	Réf. PROLABO : 00 883 922
Dispositif de filtration sur coton. Entonnoir	Réf. PROLABO : 00 451 075
Tube à hémolyse	Réf. PROLABO : 05 623 927

Expérience I.1.5.2. Page 17

Réactifs

Sel de Mohr	Réf. MERCK : 1 03792
Acide sulfurique concentré	Réf. MERCK : 1 00731
Permanganate de potassium	Réf. MERCK : 1 05080
Thiocyanate d'ammonium	Réf. MERCK : 1 01212
Alcool	Réf. MERCK : 1 00983
Acétone	Réf. MERCK : 1 00014

Matériel

Tube à essais	Réf. PROLABO : 00 883 922
Pipette graduée de 5 cm^3	Réf. PROLABO : 00 469 145
Pipette graduée de 10 cm^3	Réf. PROLABO : 00 469 203
Poire d'aspiration	Réf. PROLABO : 08 343 601
Flacon avec distributeur de 10 cm^3	Réf. PROLABO : 01 111 306 et 03 113 660
Fiole erlenmeyer de 250 cm^3	Réf. PROLABO : 09 024 070
Pipette à sang de 1 cm^3	Réf. PROLABO : 09 810 726
Bain-marie	Réf. PROLABO : 08 876 010
Fiole jaugée de 50 cm^3	Réf. PROLABO : 01 156 345
Statif	Réf. PROLABO : 08 531 122
Pince	Réf. PROLABO : 08 301 071
Noix de serrage	Réf. PROLABO : 08 540 511

Expérience I.1.6.1. Page 21

Matériel

Papier pH, gamme 1 à 10	Réf. PROLABO : 1 09526 0001
Agitateur de verre (diamètre : 2 mm, longueur ; 15 cm)	Réf. PROLABO : 50 500 096
Plaque à godets	Réf. PROLABO : 01 515 120

Expérience I.1.6.2. Page 22

Réactifs

Hydroxyde de sodium 1 mol/L	Réf. MERCK : 1 09956 (dilué 1/20)
Phosphate monopotassique	Réf. MERCK : 1 04873
Hydroxyde de sodium 1 mol/L	Réf. MERCK : 1 09956

Matériel

PH-mètre	Réf. PROLABO : 06 240 431
Burette	Réf. PROLABO : 01 005 297
Pipette de 20 cm^3	Réf. PROLABO : 00 469 293
Poire d'aspiration	Réf. PROLABO : 08 343 601
Agitateur magnétique	Réf. PROLABO : 08 933 017

Barreau aimanté	Réf. PROLABO : 08 436 203
Fiole à vide	Réf. PROLABO : 09 032 476
Trompe à vide	Réf. PROLABO : 00 391 135

Expérience I.2.1. Page 26

Matériel biologique

Glucose	Réf. MERCK : 1 04074
Fructose	Réf. MERCK : 1 04007
Saccharose	Réf. MERCK : 1 07687
Arabinose	Réf. MERCK : 1 01494
Amidon	Réf. MERCK : 1 11684
Gomme arabique	Réf. MERCK : 1 04228

Réactifs

Liqueur de Fehling :	
• Solution cuivrique (A) :	
– $CuSO_4$-$5H_2O$ pur	Réf. MERCK : 1 02787
– Acide sulfurique pur	Réf. MERCK : 1 00713
– Eau distillée	Réf. MERCK : 1 16754 9010
• Solution tartro-sodique (B) :	
– Sel de Seignette	Réf. MERCK : 1 08087
– Lessive de soude pure	Réf. MERCK : 1 05589
– Eau distillée	Réf. MERCK : 1 16754 9010
Réactif de Molisch :	
– Naphtol-1	Réf. MERCK : 1 06223
– Ethanol	Réf. MERCK : 1 00971
Réactif de Sélivanoff :	
– Résorcinol pur	Réf. MERCK : 1 07593
– Acide chlorhydrique pur	Réf. MERCK : 1 00318
– Eau distillée	Réf. MERCK : 1 16754 9010
Réactif de Bial :	
– Acide chlorhydrique pur	Réf. MERCK : 1 00318
– Orcinol pur	Réf. MERCK : 8 20933
– Perchlorure de fer	Réf. MERCK : 1 03943
Lugol :	
– Iode	Réf. MERCK : 1 04761
– Iodure de potassium	Réf. MERCK : 1 05043
Eau distillée	Réf. MERCK : 1 16754 9010

Matériel

Tube à essais	Réf. PROLABO : 00 883 922
Bec Bunsen	Réf. PROLABO : 02 497 373
Pince en bois	Réf. PROLABO : 01 788 907
Eprouvette de 10 cm^3	Réf. PROLABO : 09 015 411
Pipette de 2 cm^3	Réf. PROLABO : 00 469 065
Pipette compte-gouttes	Réf. PROLABO : 01 146 751
Poire d'aspiration	Réf. PROLABO : 08 343 601

Expérience I.2.2. Page 31

Matériel biologique

Solution d'invertase	Réf. MERCK : 1 07686
Phosphate monopotassique	Réf. MERCK : 1 04873

Réactifs	
Glucose à 5 g/L	Réf. MERCK : 1 04074
Fructose à 5 g/L	Réf. MERCK : 1 04007
Saccharose	Réf. MERCK : 1 07687
Tampon pH 4,7	
– Acétate de sodium	Réf. MERCK : 1 06268
– Acide acétique pur	Réf. MERCK : 1 00063
Liqueur de Fehling	
• Solution cuivrique (A) :	
– $CuSO_4$-$5H_2O$ pur	Réf. MERCK : 1 02787
– Acide sulfurique pur	Réf. MERCK : 1 00713
– Eau distillée	Réf. MERCK : 1 16754 9010
• Solution tartro-sodique (B) :	
– Sel de Seignette	Réf. MERCK : 1 08087
– Lessive de soude pure	Réf. MERCK : 1 05589
– Eau distillée	Réf. MERCK : 1 16754 9010
• Solution de ferrocyanure de potassium :	
– Ferrocyanure de potassium pur	Réf. MERCK : 1 04984
– Eau distillée	Réf. MERCK : 1 16754 9010
Acide trichloracétique à 60 g/L	Réf. MERCK : 1 00807
Matériel	
Burette de 25 cm^3 graduée au 1/10	Réf. PROLABO : 01 005 297
Fiole erlenmeyer de 100 cm^3	Réf. PROLABO : 09 024 046
Fiole erlenmeyer de 250 cm^3	Réf. PROLABO : 09 024 046
Pince en bois	Réf. PROLABO : 01 788 907
Bec Bunsen	Réf. PROLABO : 02 497 373
Pierre ponce	Réf. PROLABO : 26 394 290
Pipette jaugée de 10 cm^3	Réf. PROLABO : 00 379 838
Pipette jaugée de 5 cm^3	Réf. PROLABO : 00 379 827
Poire d'aspiration	Réf. PROLABO : 08 343 601
Eprouvette de 10 cm^3	Réf. PROLABO : 09 015 216
Bain thermostaté	Réf. PROLABO : 02 259 006
Statif	Réf. PROLABO : 08 531 122
Pince	Réf. PROLABO : 08 301 071
Noix de serrage	Réf. PROLABO : 08 540 511

Expérience I.2.3. Page 35

Matériel biologique	
Papier filtre plat	Réf. PROLABO : 01 764 712
Réactifs	
Réactif cupro-alcalin de Bertrand :	
• Solution cuivrique (A) :	
– $CuSO_4$-$5H_2O$ pur	Réf. MERCK : 1 02787
– Acide sulfurique pur	Réf. MERCK : 1 00713
– Eau distillée	Réf. MERCK : 1 16754 9010
• Solution tartro-sodique (B) :	
– Sel de Seignette	Réf. MERCK : 1 08087
– Lessive de soude pure	Réf. MERCK : 1 05589
– Eau distillée	Réf. MERCK : 1 16754 9010

Fiole jaugée de 100 cm^3	Réf. PROLABO : 01 156 403
Balance de précision (1/10)	Réf. PROLABO : 12 523 031
Chronomètre	Réf. PROLABO : 08 159 240

Expérience I.2.5.2. Page 45

Matériel biologique

Invertase 300 U/mg	Réf. MERCK : 1 07686
Saccharose	Réf. MERCK : 1 07687

Réactifs

Tampon pH 4,7 :	
– Acétate de sodium	Réf. MERCK : 1 06268
– Acide acétique pur	Réf. MERCK : 1 00063
Acide trichloracétique	Réf. MERCK : 1 00807

Matériel

Fiole erlenmeyer de 250 cm^3	Réf. PROLABO : 09 024 070
Pipette jaugée de 10 cm^3	Réf. PROLABO : 00 379 838
Pipette jaugée de 5 cm^3	Réf. PROLABO : 00 379 827
Poire d'aspiration	Réf. PROLABO : 08 343 601
Eprouvette de 10 cm^3	Réf. PROLABO : 09 015 216
Bain thermostaté	Réf. PROLABO : 02 259 006
Statif	Réf. PROLABO : 08 531 122
Pince	Réf. PROLABO : 08 301 071
Noix de serrage	Réf. PROLABO : 08 540 511

Expérience I.2.6.1. Page 49

Réactifs

Lugol :	
– Iode	Réf. MERCK : 1 04761
– Iodure de potassium	Réf. MERCK : 1 05043
– Eau distillée	Réf. MERCK : 1 16754 9010

Matériel

Microscope	Réf. PROLABO : 13 694 072
Erlenmeyer de 100 cm^3	Réf. PROLABO : 09 024 046
Pince en bois	Réf. PROLABO : 01 788 907
Bec Bunsen	Réf. PROLABO : 02 497 373

Expérience I.2.6.2. Page 50

Matériel biologique

Amidon	Réf. MERCK : 1 11684

Réactifs

Glucose à 20 g/L	Réf. MERCK : 1 04074
Lugol :	
– Iode	Réf. MERCK : 1 04761
– Iodure de potassium	Réf. MERCK : 1 05043
– Eau distillée	Réf. MERCK : 1 16754 9010
Liqueur de Fehling :	
• Solution cuivrique (A) :	
– $CuSO_4$-$5H_2O$ pur	Réf. MERCK : 1 02787
– Acide sulfurique pur	Réf. MERCK : 1 00713
– Eau distillée	Réf. MERCK : 1 16754 9010

• Solution tartro-sodique (B) :
  – Sel de Seignette — Réf. MERCK : 1 08087
  – Lessive de soude pure — Réf. MERCK : 1 05589
  – Eau distillée — Réf. MERCK : 1 16754 9010

Matériel

Becher de 400 cm^3	Réf. PROLABO : 09 070 535
Boudin de dialyse de 1,5 cm de diamètre	Réf. MERCK : PL 24003
Billes de verre	Réf. PROLABO : 00 680 008
Compte-gouttes	Réf. PROLABO : 00 373 144
Tube à essais	Réf. PROLABO : 00 883 922
Pince en bois	Réf. PROLABO : 01 788 907
Bec Bunsen	Réf. PROLABO : 02 497 373
Eprouvette de 10 cm^3	Réf. PROLABO : 09 015 216

Expérience I.2.6.3. Page 51

Matériel biologique

Amidon — Réf. MERCK : 1 11684 ou 1 01252

Réactifs

Acide chlorhydrique — Réf. MERCK : 1 09057 ou 1 00318

Lugol :
– Iode — Réf. MERCK : 1 04761
– Iodure de potassium — Réf. MERCK : 1 05043
– Eau distillée — Réf. MERCK : 1 16754 9010

Liqueur de Fehling :
• Solution cuivrique (A) :
  – $CuSO_4$-$5H_2O$ pur — Réf. MERCK : 1 02787
  – Acide sulfurique pur — Réf. MERCK : 1 00713
  – Eau distillée — Réf. MERCK : 1 16754 9010
• Solution tartro-sodique (B) :
  – Sel de Seignette — Réf. MERCK : 1 08087
  – Lessive de soude pure — Réf. MERCK : 1 05589
  – Eau distillée — Réf. MERCK : 1 16754 9010

Matériel

Fiole erlenmeyer de 150 cm^3	Réf. PROLABO : 09 024 046
Eprouvette de 100 cm^3	Réf. PROLABO : 09 024 046
Pipette graduée de 5 cm^3	Réf. PROLABO : 00 469 145
Poire d'aspiration	Réf. PROLABO : 08 343 601
Tube à essais	Réf. PROLABO : 00 883 922
Portoir tubes à essais	Réf. PROLABO : 05 644 133
Bain-marie	Réf. PROLABO : 08 876 010
Pipette graduée de 2 cm^3	Réf. PROLABO : 00 469 065
Compte-gouttes	Réf. PROLABO : 00 373 144
Eprouvette de 10 cm^3	Réf. PROLABO : 09 015 216
Chronomètre	Réf. PROLABO : 08 159 240

Expérience I.2.6.4. Page 53

Matériel biologique

– Amidon soluble — Réf. MERCK : 1 01252

Expérience I.2.6.5.	Page 55
Réactifs	
Lugol (solution iodo-iodurée) :	
– Iode	Réf. MERCK : 1 04761
– Iodure de potassium	Réf. MERCK : 1 05043
– Eau distillée	Réf. MERCK : 1 16754 9010
Matériel	
Microscope	Réf. PROLABO : 13 694 072
Lames	Réf. PROLABO : 05 632 298
Lamelles	Réf. PROLABO : 05 642 604
Scalpel	Réf. PROLABO : 05 780 452
Aiguille lancéolée	Réf. PROLABO : 05 619 934
Expérience I.2.7.	Page 60
Réactifs	
Glycérine anhydre	Réf. MERCK : 1 12011
Ethanol	Réf. MERCK : 1 00971
Matériel	
Microscope	Réf. PROLABO : 13 694 072
Lames	Réf. PROLABO : 05 632 298
Lamelles	Réf. PROLABO : 05 642 604
Aiguille lancéolée	Réf. PROLABO : 05 619 934
Expérience I.3.1.	Page 64
Matériel biologique	
Pancréatine	Réf. MERCK : 1 07130
Sérum-albumine	Réf. MERCK : 1 12018
NaCl	Réf. MERCK : 1 0604
Réactifs	
Tampon phosphate :	
– KH_2PO_4	Réf. MERCK : 1 04873
– Soude à 1 mol/L	Réf. MERCK : 1 09137
Eau distillée	Réf. MERCK : 1 16754 9010
Glycine à 5 g/L	Réf. MERCK : 8 16013
Proline	Réf. MERCK : 1 07434
Ninhydrine à 5 g/L	Réf. MERCK : 1 06762
Ethanol	Réf. MERCK : 1 00971
Tyrosine	Réf. MERCK : 1 08371
Tryptophane à 5 g/L	Réf. MERCK : 1 08374
Réactif de Millon :	
– Mercure	Réf. MERCK : 1 04401
– Acide nitrique concentré	Réf. MERCK : 1 01518
– Eau distillée	Réf. MERCK : 1 16754 9010
Acide sulfurique concentré	Réf. MERCK : 1 00731
Réactif glyoxylique :	
– Chloral hydraté pur cristallisé	Réf. MERCK : 1 02425
– Eau distillée	Réf. MERCK : 1 16754 9010
– Carbonate de calcium pur	Réf. MERCK : 1 02069
KOH	Réf. MERCK : 1 05032
Naphtol-1 à 1 g/L	Réf. MERCK : 1 06223
Urée à 50 g/L	Réf. MERCK : 1 08486

Solution d'hypobromite :	
– Brome	Réf. MERCK : 1 01948
– NaOH à 5 g/L	Réf. MERCK : 1 09137
Matériel	
Bain thermostaté	Réf. PROLABO : 02 259 006
Portoir tubes à essais	Réf. PROLABO : 05 644 133
Tube à essais	Réf. PROLABO : 00 883 922
Fiole erlenmeyer de 100 cm^3	Réf. PROLABO : 09 024 046
Pipette de 5 cm^3	Réf. PROLABO : 00 379 827
Pipette de 2 cm^3	Réf. PROLABO : 00 379 816
Pipette de 1 cm^3	Réf. PROLABO : 00 379 805
Compte-gouttes	Réf. PROLABO : 01 146 751
Eprouvette de 10 cm^3	Réf. PROLABO : 09 015 216
Becher de 250 cm^3	Réf. PROLABO : 09 070 488
Poire d'aspiration	Réf. PROLABO : 01 884 922

Expérience I.3.2. Page 67

Réactifs	
Lessive de soude	Réf. MERCK : 1 05589
Solution de sulfate de cuivre à 10 g/L :	
– $CuSO_4$-$5H_2O$ pur	Réf. MERCK : 1 02787
– Acide sulfurique pur	Réf. MERCK : 1 00731
Acide acétique dilué au 1/10	Réf. MERCK : 1 00063
Acide nitrique concentré	Réf. MERCK : 1 01518
Acide trichloracétique à 300 g/L	Réf. MERCK : 1 00807
Réactif de Tanret :	
– Iodure de potassium pur cristallisé	Réf. MERCK : 1 05043
– Chlorure mercurique pur	Réf. MERCK : 1 04417
– Acide acétique cristallisable	Réf. MERCK : 8 18755
– Eau distillée	Réf. MERCK : 1 16754 9010
Sulfate de magnésium cristallisé	Réf. MERCK : 1 06067
Sulfate d'ammonium cristallisé	Réf. MERCK : 1 01216
Ethanol 95 vol.	Réf. MERCK : 1 00971
Matériel	
Tube à essais	Réf. PROLABO : 00 883922
Pipette de 1 cm^3	Réf. PROLABO : 00 469 010 ou 00 379 805
Tubes à essais	Réf. PROLABO : 00 883 922
Pipette de 1 cm^3	Réf. PROLABO : 00 379 805
Pipette de 2 cm^3	Réf. PROLABO : 00 379 816
Pipette de 5 cm^3	Réf. PROLABO : 00 379 827
Poire d'aspiration	Réf. PROLABO : 08 343 601
Eprouvette de 10 cm^3	Réf. PROLABO : 09 015 216
Compte-gouttes	Réf. PROLABO : 01 146 751
Dispositif de filtration : petit entonnoir de verre	Réf. PROLABO : 00 451 075
Filtre plissé	Réf. PROLABO : 08 322 712

Expérience I.3.3. Page 70

Réactifs	
Réactif de Gornall :	
- Sulfate de cuivre-5 H_2O	Réf. MERCK : 1 02787

- Tartrate double de sodium	
et de potassium (sel de Seignette)	Réf. MERCK : 1 08087
- Soude (pastilles)	Réf. MERCK : 1 06469
- Iodure de potassium	Réf. MERCK : 1 05043
- Eau distillée	Réf. MERCK : 1 16754 9010
Eau physiologique à 9 g de NaCl/L	Réf. MERCK : 1 06400
Sérum-albumine à 5 g/L	Réf. MERCK : 1 12018
Matériel	
Tube à essais	Réf. PROLABO : 00 883 922
Pipette graduée de 1 cm^3	Réf. PROLABO : 00 469 010
Pipette jaugée de 1 cm^3	Réf. PROLABO : 00 379 805
Pipette graduée de 5 cm^3	Réf. PROLABO : 00 469 145
Poire d'aspiration	Réf. PROLABO : 08 343 601
Fiole jaugée de 250 cm^3	Réf. PROLABO : 01 156 471
Spectrophotomètre	Réf. PROLABO : 05 525 906 et 05 525 917

Expérience I.3.4.	Page 72
Réactifs	
Acide sulfurique concentré	Réf. MERCK : 1 00731
Sulfate de potassium	Réf. MERCK : 1 05153
Catalyseur de minéralisation Prolabo	Réf. PROLABO : 22 550 293
Acide sulfurique titré à 0,05 mol/L	Réf. MERCK : 1 09074
Lessive de soude	Réf. MERCK : 1 05589
Acide borique à 40 g/L	Réf. MERCK : 1 00160
Réactif de Tashiro :	
– Rouge de méthyle à 0,5 g/L	Réf. MERCK : 1 06076
– Ethanol à 95 vol.	Réf. MERCK : 1 00971
– Bleu de méthylène à 1 g/L	Réf. MERCK : 1 06045
Matériel	
Appareil à distiller de Kjeldahl	Réf. PROLABO : 03 044 205 ou 03 042 208 ou 09 243 271
Rampe de minéralisation	Réf. PROLABO : 06 345 307
Matras de minéralisation de 100 cm^3	Réf. PROLABO : 03 095 438
Pipette de 5 cm^3	Réf. PROLABO : 00 379 827
Poire d'aspiration	Réf. PROLABO : 08 343 601
Eprouvette de 20 cm^3	Réf. PROLABO : 09 015 295
Billes de verre	Réf. PROLABO : 00 680 008
Eprouvette de 100 cm^3	Réf. PROLABO : 09 015 411
Burette de 25 cm^3 graduée au 1/10	Réf. PROLABO : 01 005 297
Pince en bois	Réf. PROLABO : 01 788 907

Expérience I.3.5.	Page 76
Réactifs	
Solution tampon phosphate pH 6,1 :	
– Na_2HPO_4 anhydre	Réf. MERCK : 1 06586
– KH_2PO_4 anhydre	Réf. MERCK : 1 04873
Mélange témoin d'acides aminés :	
– Acide aspartique	Réf. MERCK : 1 00126
– Glycine à 2 g/L	Réf. MERCK : 8 16013
– Lysine à 2 g/L	Réf. MERCK : 1 05700

Cholestérol	Réf. MERCK : 1 03672
Lécithine	Réf. PROLABO : 24 966 180
Réactifs	
Premier solvant	
– Trichloro 1.1.1. éthane	Réf. MERCK : 1 08749
– Méthanol	Réf. MERCK : 1 06009
– Eau distillée	Réf. MERCK : 1 16754 9010
Deuxième solvant	
– Ether de pétrole (benzine de pétrole)	Réf. MERCK : 1 01775
– Ether	Réf. MERCK : 1 00921
– Acide acétique	Réf. MERCK : 1 00063
Solutions témoins	
– Trichloro 1.1.1. éthane	Réf. MERCK : 1 08749
– Méthanol	Réf. MERCK : 1 06009
Solution de ninhydrine à 2 g/L dans le butanol	Réf. PROLABO : 30 960 226
Matériel	
Cuve pour chromatographie	Réf. PROLABO : 14 730 006
Chromatoplaque (CCM)	Réf. PROLABO : 32 222 606
Pipette capillaire	Réf. PROLABO : 09 804 907
Thermoventilateur	Réf. PROLABO : 03 652 024
Cuve à iode (cuve pour chromatographie)	Réf. PROLABO : 14 730 006
Expérience I.4.2.	Page 101
Matériel biologique	
Acide oléique	Réf. MERCK : 1 00471
Butanol	Réf. MERCK : 1 01990
Ethanol	Réf. MERCK : 1 00971
Réactifs	
Potasse alcoolique :	
– KOH pure en pastilles	Réf. MERCK : 1 05032
– Ethanol pur	Réf. MERCK : 1 00971
Solution de phénolphtaléine :	
– Phénolphtaléine	Réf. MERCK : 1 07233
– Ethanol à 95 vol.	Réf. MERCK : 1 00971
– Acide acétique	Réf. MERCK : 1 00063
Acide chlorhydrique à 1 mol/L dilué au 1/5	Réf. MERCK : 1 09057
Solvant isobutanol-éthanol	Réf. MERCK : 1 00984 et 1 00971
Réactif de Wijs	Réf. MERCK : 1 09163
Iodure de potassium	Réf. MERCK : 1 05043
Thiosulfate de sodium	Réf. MERCK : 1 09950
Tétrachlorure de carbone	Réf. MERCK : 1 0208
Trichloro 1.1.1. éthane	Réf. MERCK : 1 08749
Matériel	
Fiole erlenmeyer de 150 cm^3	Réf. PROLABO : 09 024 046
Pipette de 10 cm^3	Réf. PROLABO : 00 469 203 ou 00 379 838
Poire d'aspiration	Réf. PROLABO : 08 343 601
Burette	Réf. PROLABO : 01 005 297
Tube à hémolyse	Réf. PROLABO : 05 623 927

Fiole de 200 cm^3	Réf. PROLABO : 01 156 458
Pipette de 20 cm^3	Réf. PROLABO : 00 469 293
Eprouvette de 20 cm^3	Réf. PROLABO : 09 015 295
Eprouvette de 100 cm^3	Réf. PROLABO : 09 015 411
Balance de précision	Réf. PROLABO : 12 523 031
Pipette compte-gouttes	Réf. PROLABO : 01 146 751

Expérience I.4.3. Page 106

Réactifs

Rouge Soudan III	Réf. PROLABO : 34 060 187
Alcool à 70 %	Réf. MERCK : 1 00971

Matériel

Microscope	Réf. PROLABO : 13 694 072
Lames	Réf. PROLABO : 05 632 298
Lamelles	Réf. PROLABO : 05 642 604
Scalpel	Réf. PROLABO : 05 780 452
Aiguille lancéolée	Réf. PROLABO : 05 619 934

Expérience I.5.1. Page 110

Réactifs

Solution STE :	
– Saccharose	Réf. MERCK : 1 07687
– EDTA	Réf. MERCK : 1 12029
– Tris-HCl :	
– Tris	Réf. MERCK : 1 08382
– HCl à 1 mol/L	Réf. MERCK : 1 09057
Tampon TE :	
– Tampon Tris	Réf. MERCK : 1 08382
– EDTA	Réf. MERCK : 1 12029
– HCl à 1 mol/L	Réf. MERCK : 1 09057
Solution de SDS :	
– Dodécylsulfate, sel de sodium	Réf. MERCK : 1 12912
Solution de $NaClO_4$:	
– $NaClO_4$, H_2O	Réf. MERCK : 1 06564
Trichloro-1.1.1. éthane	Réf. MERCK : 1 08749
Alcool isoamylique	Réf. MERCK : 1 00978
Ethanol 95 vol.	Réf. MERCK : 1 00971

Matériel

Broyeur de Potter de Thomas de 30 cm^3	Réf. PROLABO : 01 029 302
Becher de 250 cm^3	Réf. PROLABO : 09 070 488
Ciseaux de dissection gros modèle	Réf. PROLABO : 05 671 147
Petits agitateurs	Réf. PROLABO : 08 509 193
Pipette graduée de 5 cm^3	Réf. PROLABO : 00 469 145
Pipette graduée de 2 cm^3	Réf. PROLABO : 00 469 065
Pipette graduée de 10 cm^3	Réf. PROLABO : 00 469 203
Poire d'aspiration	Réf. PROLABO : 08 343 601
Eprouvette de 20 cm^3	Réf. PROLABO : 09 015 295
Eprouvettede 50 cm^3	Réf. PROLABO : 09 015 353
Eprouvette de 100 cm^3	Réf. PROLABO : 09 015 411
Centrifugeuse réfrigérée	Réf. PROLABO : 75 008 152
Papier Joseph	Réf. PROLABO : 01 768 748

Dessiccateur	Réf. PROLABO : 00 646 307
Congélateur	Réf. PROLABO : 73 710 703
Bain thermostaté à 60 °C	Réf. PROLABO : 02 259 006

Expérience I.5.2. Page 113

Réactifs

Tampon TE :	
– Tampon Tris	Réf. MERCK : 1 08382
– EDTA	Réf. MERCK : 1 12029
– HCl à 1 mol/L	Réf. MERCK : 1 09057

Matériel

Spectrophotomètre UV double faisceau avec enregistreur	Réf. PROLABO : 05 802 906 et 05 525 917
Cuves spectrophotométriques UV (quartz ou plastique transparent aux UV)	Réf. PROLABO : 05 802 106 ou 05 928 908

Expérience I.6.1. Page 116

Réactifs

Liqueur de Fehling :	
• Solution cuivrique (A) :	
– $CuSO_4$-$5H_2O$ pur	Réf. MERCK : 1 02787
– Acide sulfurique pur	Réf. MERCK : 1 00713
– Eau distillée	Réf. MERCK : 1 16754 9010
• Solution tartro-sodique (B) :	
– Tartrate double de potassium et de sodium (sel de Seignette)	Réf. MERCK : 1 08087
– Lessive de soude pure	Réf. MERCK : 1 05589
– Eau distillée	Réf. MERCK : 1 16754 9010
Solution de 2-6 dichlorophénolindophénol :	
– 2-6 dichlorophénolindophénol	Réf. MERCK : 1 03028
– Eau distillée	Réf. MERCK : 1 16754 9010
Tampon phosphate pH 6,8 :	
– KH_2PO_4	Réf. MERCK : 1 04873
– HCl 1 mol/L	Réf. MERCK : 1 09057

Matériel

Dispositif de filtration sur filtre plissé :	
– Entonnoir	Réf. PROLABO : 00 451 075
– Filtres plissés	Réf. PROLABO : 08 322 712
Pipette graduée de 2 cm^3	Réf. PROLABO : 00 469 065
Pipette graduée de 5 cm^3	Réf. PROLABO : 00 469 145
Poire d'aspiration	Réf. PROLABO : 08 343 601
Tube à essais	Réf. PROLABO : 00 883 922
Pince en bois	Réf. PROLABO : 01 788 907
Pipette compte-gouttes	Réf. PROLABO : 01 146 751
Eprouvette de 10 cm^3	Réf. PROLABO : 09 015 216

Expérience I.6.2. Page 118

Réactifs

Solution de 2-6 dichlorophénolindophénol :	
– 2-6 dichlorophénolindophénol	Réf. MERCK : 1 03028
– Eau distillée	Réf. MERCK : 1 16754 9010

– KH_2PO_4	Réf. MERCK : 1 04873
– HCl 1 mol/L	Réf. MERCK : 1 09057
Solution d'acide ascorbique pur	Réf. MERCK : 1 00127
Solution d'acide métaphosphorique à 20 g/L :	
– Acide métaphosphorique	Réf. MERCK : 1 00546
– Eau distillée	Réf. MERCK : 1 16754 9010
Matériel	
Dispositif de filtration sur filtre plissé :	
– Entonnoir	Réf. PROLABO : 00 451 075
– Filtres plissés	Réf. PROLABO : 08 322 712
Burette de 25 cm^3	Réf. PROLABO : 01 005 297
Fiole erlenmeyer de 150 cm^3	Réf. PROLABO : 09 024 046
Pipette jaugée de 5 cm^3	Réf. PROLABO : 00 379 827
Poire d'aspiration	Réf. PROLABO : 08 343 601

Expérience I.7.1. Page 122

Réactifs	
Solvant de chromatographie :	
– Dichlorométhane	Réf. MERCK : 1 06050
– Méthanol	Réf. MERCK : 1 06009
Carbonate de calcium	Réf. MERCK : 1 02069
Acétone	Réf. MERCK : 1 00014
Matériel	
Dispositif de filtration sur filtre plissé :	
– Entonnoir	Réf. PROLABO : 00 451 075
– Filtres plissés	Réf. PROLABO : 08 322 712
Eprouvette de 20 cm^3	Réf. PROLABO : 09 015 295
Fiole erlenmeyer de 100 cm^3	Réf. PROLABO : 09 024 046
Cuve à chromatographie	Réf. PROLABO : 14 730 006
Papier Whatman n° 1	Réf. PROLABO : 06 091 936
Mortier	Réf. PROLABO : 01 447 341
Pilon	Réf. PROLABO : 01 457 106
Pipette capillaire	Réf. PROLABO : 09 804 907
Thermoventilateur	Réf. PROLABO : 03 652 024

Expérience I.7.2. Page 124

Réactifs	
Solvant de chromatographie :	
– Dichlorométhane	Réf. MERCK : 1 06050
– Méthanol	Réf. MERCK : 1 06009
Carbonate de calcium	Réf. MERCK : 1 02069
Acétone	Réf. MERCK : 1 00014
Matériel	
Dispositif de filtration sur filtre plissé :	
– Entonnoir	Réf. PROLABO : 00 451 075
– Filtres plissés	Réf. PROLABO : 08 322 712
Eprouvette de 20 cm^3	Réf. PROLABO : 09 015 295
Mortier	Réf. PROLABO : 01 447 341
Pilon	Réf. PROLABO : 01 457 106
Fiole erlenmeyer de 100 cm^3	Réf. PROLABO : 09 024 046
Colonne de chromatographie	Réf. PROLABO : 33 36 608

Suspension d'alumine pour chromatographie, granulométrie 63-200 µm	Réf. MERCK : 1 010097 1000
Portoir de tubes à essais	Réf. PROLABO : 05 644 133
Spectrophotomètre visible bifaisceau avec enregistreur, à défaut un spectrophotomètre monofaisceau	Réf. PROLABO : 05 525 906 ou 05 525 917
Cuves spectrophotométriques en verre	Réf. PROLABO : 05 802 106

Partie II

Expérience II.8.2. Page 130

Matériel biologique et réactifs

Solution tampon phosphate pH 7,1 :	
– KH_2PO_4	Réf. MERCK : 1 04873
– Solution NaOH 1 mol/L	Réf. MERCK : 1 09137
– Eau distillée	Réf. MERCK : 1 16754 9010
Solution tamponnée de substrat (pH 7,1) :	
– Amidon soluble	Réf. MERCK : 1 01252
– Solution tampon phosphate pH 7,1 : KH_2PO_4	Réf. MERCK : 1 04873
– NaCl	Réf. MERCK : 1 0604
Solution tamponnée de pancréatine (pH 7,1) :	
– Pancréatine	Réf. MERCK : 1 07130
– Solution tampon phosphate pH 7,1 : KH_2PO_4	Réf. MERCK : 1 04873
Solution d'inuline tamponnée à pH 7,1 :	
– Inuline	Réf. MERCK : 1 04738
– Solution tampon phosphate pH 7 : KH_2PO_4	Réf. MERCK : 1 04873
– NaCl	Réf. MERCK : 1 0604
Lugol (solution iodo-iodurée) :	
– Iode	Réf. MERCK : 1 04761
– Iodure de potassium	Réf. MERCK : 1 05043
– Eau distillée	Réf. MERCK : 1 16754 9010
Acide chlorhydrique 1 mol/L	Réf. MERCK : 1 09057
Hydroxyde de sodium 1 mol/L	Réf. MERCK : 1 09956
Liqueur de Fehling :	
• Solution cuivrique (A) :	
– CuSO4-5H2O pur	Réf. MERCK : 1 02787
– Acide sulfurique pur	Réf. MERCK : 1 00713
– Eau distillée	Réf. MERCK : 1 16754 9010
• Solution tartro-sodique (B) :	
– Sel de Seignette	Réf. MERCK : 1 08087
– Lessive de soude pure	Réf. MERCK : 1 05589
– Eau distillée	Réf. MERCK : 1 16754 9010
Solution tampon citrate-acide chlorhydrique pH 3 :	
– Acide citrique pur	Réf. MERCK : 1 00241
– Soude 1 mol/L	Réf. MERCK : 1 09137
– Eau distillée	Réf. MERCK : 1 16754 9010
– Acide chlorhydrique 1 mol/L	Réf. MERCK : 1 09057
Solution tamponnée de substrat (pH 3) :	
– Amidon soluble	Réf. MERCK : 1 01252

– Solution tampon citrate-acide chlorhydrique pH 3 :

– Citrate de sodium	Réf. MERCK : 1 10037
– HCl 1 mol/L	Réf. MERCK : 1 09057
– NaCl	Réf. MERCK : 1 0604
Solution tamponnée de pancréatine (pH 3) :	
– Pancréatine	Réf. MERCK : 1 07130
Solution tampon glycine-soude pH 12 :	
– Glycine	Réf. MERCK : 8 16013
– NaCl	Réf. MERCK : 1 0604
– Eau distillée	Réf. MERCK : 1 16754 9010
– Soude 1 mol/L	Réf. MERCK : 1 09137
Solution tamponnée de substrat (pH 12) :	
– Amidon soluble	Réf. MERCK : 1 01252
– Solution tampon glycine-soude pH 12 :	
– Glycine	Réf. MERCK : 8 16013
– NaOH 1 mol/L	Réf. MERCK : 1 09137
– NaCl	Réf. MERCK : 1 0604
Solution tamponnée de pancréatine (pH 12) :	
– Pancréatine	Réf. MERCK : 1 07130
Matériel	
Bain thermostaté	Réf. PROLABO : 02 259 006
Cristallisoir	Réf. PROLABO : 03 082 582
Portoir de tubes à essais	Réf. PROLABO : 05 644 133
Tube à essais	Réf. PROLABO : 00 883 922
Pipette jaugée de 5 cm^3	Réf. PROLABO : 00 379 827
Pipette compte-gouttes	Réf. PROLABO : 01 146 751
Fiole erlenmeyer de 250 cm^3	Réf. PROLABO : 09 024 070
Pipette de 2 cm^3	Réf. PROLABO : 00 469 065 ou 00 379 816
Poire d'aspiration	Réf. PROLABO : 08 343 601
Eprouvette de 10 cm^3	Réf. PROLABO : 09 015 216
Boudin de dialyse	Réf. MERCK : PL 24 003

Expériences II.9.1., II.9.2., II.9.3.	Pages 136, 139, 143
Matériel biologique et réactifs	
– Phosphatase alcaline	Réf. MERCK : 1 11631
– Tampon DEA	Réf. BOEHRINGER : 1 08162
– Paranitrophénylphosphate disodique	Réf. MERCK : 1 06850
– Diéthanolamine	Réf. PROLABO : 23 374 291
– Na_2HPO_4-$2H_2O$	Réf. MERCK : 1 06566
Matériel	
Bain thermostaté	Réf. PROLABO : 02 259 006
Spectrophotomètre visible	Réf. PROLABO : 05 525 906 ou 05 525 917
Cuve pour spectrophotomètre	Réf. PROLABO : 05 802 106
Tube à essais	Réf. PROLABO : 00 883 992
Portoir pour tubes à essais	Réf. PROLABO : 05 644 133
Pipette graduée de 5 cm^3	Réf. PROLABO : 00 469 145
Pipette graduée de 2 cm^3	Réf. PROLABO : 00 469 065
Pipette jaugée de 2 cm^3	Réf. PROLABO : 00 379 816
Pipette jaugée de 1 cm^3	Réf. PROLABO : 00 379 805

Pipette graduée de 1 cm^3	Réf. PROLABO : 00 469 010
Poire d'aspiration	Réf. PROLABO : 08 343 601

Expérience II.10. Page 146

Réactifs

NADH-H^+	Réf. MERCK : 1 24543
NAD^+	Réf. MERCK : 1 24542

Matériel

Spectrophotomètre UV	Réf. PROLABO : 05 525 906 et 05 525 917
Cuves spéciales UV pour spectrophotomètre	Réf. PROLABO : 05 928 908
Balance de précision (sensible au 1/10 de mg)	Réf. PROLABO : 12 523 031
Fiole jaugée de 100 cm^3	Réf. PROLABO : 01 156 403

Expérience II.11. Page 150

Réactifs

Coffret de dosage du D-glucose dans les aliments	Réf. BOEHRINGER : 716251

Matériel

Spectrophotomètre	Réf. PROLABO : 05 525 906 et 05 525 917
Cuves pour spectrophotomètre	Réf. PROLABO : 05 928 908
Fiole jaugée de 10 cm^3	Réf. PROLABO : 01 156 208
Fiole jaugée de 100 cm^3	Réf. PROLABO : 01 156 403
Pipette de 1 cm^3	Réf. PROLABO : 09 810 726 ou 00 379 805
Micropipette de 0,1 cm^3	Réf. PROLABO : 01 285 055
Pipette graduée de 2 cm^3	Réf. PROLABO : 00 469 065
Poire d'aspiration	Réf. PROLABO : 08 343 601
Micropipette de 20 µL	Réf. PROLABO : 01 285 011

Partie III

Expérience III.12.2. Page 159

Réactifs et milieux

Tube d'eau distillée	Réf. MERCK : 1 16754 9010
Tube de bouillon ordinaire	Réf. MERCK : 1 05443

Matériel

Pipette Pasteur	Réf. PROLABO : 09 085 013
Lime à ampoule	Réf. PROLABO : 01 921 522
Poire d'aspiration adaptable à la pipette Pasteur	Réf. PROLABO : 08 884 911
Etuve de bactériologie réglée à 37 °C	Réf. PROLABO : 03 571 092

Expérience III.12.3. Page 161

Réactifs et milieux

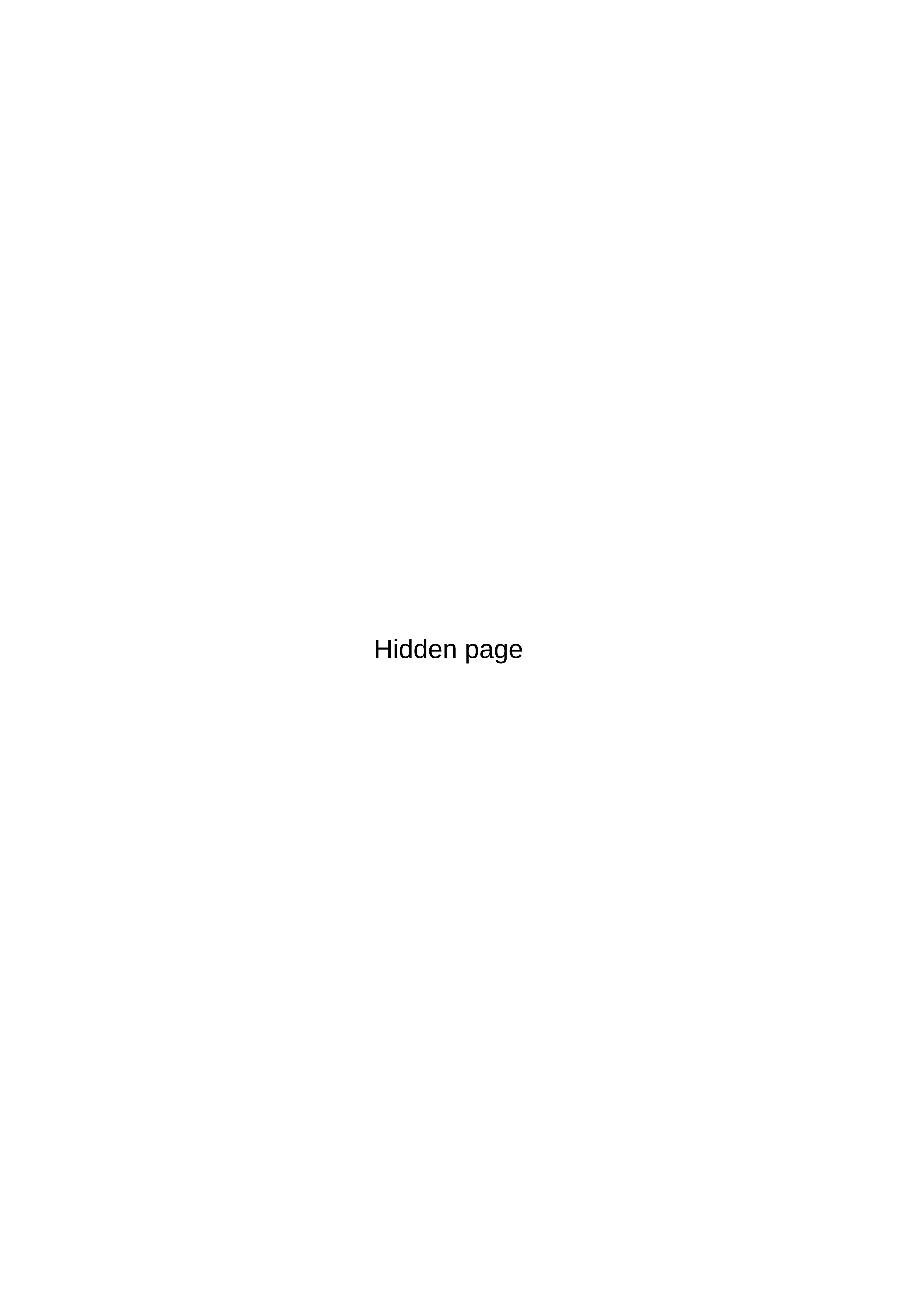
Tube d'eau distillée	Réf. MERCK : 1 16754 9010
Gélose trypticase-soja (GTS)	Réf. MERCK : 1 05458

Matériel

Boîte de Pétri	Réf. PROLABO : 03 047 012
Ose	Réf. PROLABO : 01 147 641

Etuve de bactériologie réglée à 37 °C	Réf. PROLABO : 03 571 092
Pipette Pasteur boutonnée	Réf. PROLABO : 09 088 503
Expérience III.13.1.	Page 166
Réactifs	
Bleu de méthylène à 2 %	Réf. MERCK : 1 06045
Alcool à 90 vol.	Réf. MERCK : 1 00983
Huile à immersion	Réf. MERCK : 13 814 000
Matériel	
Bac à coloration	Réf. PROLABO : 07 156 037
Lames	Réf. PROLABO : 05 632 298
Pipette Pasteur	Réf. PROLABO : 09 085 013
Microscope	Réf. PROLABO : 13 694 072
Expérience III.13.2.	Page 169
Matériel biologique	
Bactisubtil	Réf. MERCK : 1 10649
Ose	Réf. PROLABO : 01 147 641
Tube de bouillon ordinaire	Réf. MERCK : 1 05443
Réactifs	
Bleu de méthylène à 2 %	Réf. MERCK : 1 06045
Alcool à 90 vol.	Réf. MERCK : 1 00983
Huile à immersion	Réf. MERCK : 13 814 000
Matériel	
Bac à coloration	Réf. PROLABO : 07 156 037
Lames	Réf. PROLABO : 05 632 298
Pipette Pasteur	Réf. PROLABO : 09 085 013
Microscope	Réf. PROLABO : 13 694 072
Expérience III.13.3.	Page 172
Réactifs	
Bleu coton	Réf. MERCK : 1 16316
Glucose	Réf. MERCK : 1 04074
Matériel	
Bac à coloration	Réf. PROLABO : 07 156 037
Lames	Réf. PROLABO : 05 632 298
Pipette Pasteur	Réf. PROLABO : 09 085 013
Ose	Réf. PROLABO : 01 147 641
Microscope	Réf. PROLABO : 13 694 072
Expérience III.14.1.	Page 175
Réactifs	
Bleu de violet cristallisé	Réf. MERCK : 1 09218
Safranine	Réf. MERCK : 1 09217
Alcool à 90 vol.	Réf. MERCK : 1 00983
Lugol (solution iodo-iodurée) :	
– Iode	Réf. MERCK : 1 04761
– Iodure de potassium	Réf. MERCK : 1 05043
– Eau distillée	Réf. MERCK : 1 16754 9010
Huile à immersion	Réf. MERCK : 13 814 000
Matériel	
Bac à coloration	Réf. PROLABO : 07 156 037

Pince en acier inoxydable à bouts ronds	Réf. PROLABO : 01 241 544
Lames	Réf. PROLABO : 05 632 298
Pipette Pasteur	Réf. PROLABO : 09 085 013
Microscope	Réf. PROLABO : 13 694 072
Pissette d'eau	Réf. PROLABO : 06 611 477
Expérience III.14.2.	Page 177
Réactifs	
Bleu de violet cristallisé	Réf. MERCK : 1 09218
Safranine	Réf. MERCK : 1 09217
Alcool à 90 vol.	Réf. MERCK : 1 00983
Lugol (solution iodo-iodurée) :	
– Iode	Réf. MERCK : 1 04761
– Iodure de potassium	Réf. MERCK : 1 05043
– Eau distillée	Réf. MERCK : 1 16754 9010
Huile à immersion	Réf. MERCK : 13 814 000
Matériel	
Bac à coloration	Réf. PROLABO : 07 156 037
Lames	Réf. PROLABO : 05 632 298
Pipette Pasteur	Réf. PROLABO : 09 085 013
Ose	Réf. PROLABO : 01 147 641
Tube à hémolyse stérile	Réf. PROLABO : 05 623 927
Microscope	Réf. PROLABO : 13 694 072
Expérience III.15.1.	Page 180
Matériel biologique	
Bactisubtil	Réf. MERCK : 1 10643
Réactifs et milieux	
Tube de bouillon ordinaire	Réf. MERCK : 1 05443
Bleu de violet cristallisé	Réf. MERCK : 1 09218
Safranine	Réf. MERCK : 1 09217
Alcool à 90 vol.	Réf. MERCK : 1 00983
Lugol (solution iodo-iodurée) :	
– Iode	Réf. MERCK : 1 04761
– Iodure de potassium	Réf. MERCK : 1 05043
– Eau distillée	Réf. MERCK : 1 16754 9010
Huile à immersion	Réf. MERCK : 13 814 000
Matériel	
Ose	Réf. PROLABO : 01 147 641
Bac à coloration	Réf. PROLABO : 07 156 037
Lames	Réf. PROLABO : 05 632 298
Pipette Pasteur	Réf. PROLABO : 09 085 013
Microscope	Réf. PROLABO : 13 694 072
Etuve réglée à 37 °C	Réf. PROLABO : 03 571 092
Expérience III.15.2.	Page 181
Réactifs et milieux	
Gélose trypticase-soja	Réf. MERCK : 1 05458
Matériel	
Pipette Pasteur	Réf. PROLABO : 09 085 013
Ose	Réf. PROLABO : 01 147 641


Hidden page

Pince fine	Réf. PROLABO : 05 766 112
Aiguille montée	Réf. PROLABO : 05 619 923

Expérience IV.21.6. — Page 231

Matériel

Microscope	Réf. PROLABO : 13 694 072
Pince	Réf. PROLABO : 08 301 071
Aiguille droite	Réf. PROLABO : 05 619 923
Scalpel	Réf. PROLABO : 05 780 452
Lames	Réf. PROLABO : 05 632 298
Lamelles	Réf. PROLABO : 05 642 604
Compte-gouttes	Réf. PROLABO : 01 146 751

Expérience IV.21.7. — Page 234

Réactifs

Gélatine glycérinée	Réf. MERCK : 1 09242
Alcool à 90°	Réf. MERCK : 1 00983
Alcool absolu	Réf. MERCK : 1 00983
Toluène	Réf. PROLABO : 28 676 297
Hypochlorite de sodium ou de potassium	Réf. MERCK : 1 05614
Eau acétique à 10 %	Réf. MERCK : 1 00056
Vert d'iode	Réf. PROLABO : 34 194 134
Carmin aluné	Réf. PROLABO : 35 007 204
Carmin aluné :	
– Carmin n° 40	Réf. PROLABO : 34 038 135
– Alun de potasse	Réf. MERCK : 1 01042
– Eau distillée	Réf. MERCK : 1 16754 9010
– Acide phénique = phénol	Réf. MERCK : 1 00206
Vert d'iode :	
– Vert d'iode	Réf. PROLABO : 34 194 134
– Alcool à 60°	Réf. MERCK : 1 00983
– Eau distillée	Réf. MERCK : 1 16754 9010
Carmino-vert (ou réactif de Mirande) :	
– Vert d'iode	Réf. PROLABO : 34 194 134
– Alcool à 60°	Réf. MERCK : 1 00983
– Carmin aluné à 1 %	Réf. PROLABO : 35 007 204

Matériel

Microscope	Réf. PROLABO : 13 694 072
Lames	Réf. PROLABO : 05 632 298
Lamelles	Réf. PROLABO : 05 642 604
Aiguille lancéolée	Réf. PROLABO : 05 619 934
Scalpel	Réf. PROLABO : 05 780 452
Verre de montre	Réf. PROLABO : 09 446 090
Baume du Canada	Réf. PROLABO : 21 776 183
Mortier	Réf. PROLABO : 01 447 347
Pilon	Réf. PROLABO : 01 457 106

Expérience IV.21.8. — Page 242

Réactifs

Solution de carmin acétique :	
– Eau distillée	Réf. MERCK : 1 16754 9010

Poire d'aspiration	Réf. PROLABO : 08 343 601
Pipette capillaire	Réf. PROLABO : 09 804 907
Microscope	Réf. PROLABO : 13 694 072

Expérience IV.23.2. Page 266

Matériel	
Tubes de verre de 5 mm de diamètre	Réf. PROLABO : 00 531 642
Lames	Réf. PROLABO : 05 632 298
Lamelles	Réf. PROLABO : 05 642 604
Microscope	Réf. PROLABO : 13 694 072
Pince fine	Réf. PROLABO : 05 766 112
Pipette	Réf. PROLABO : 09 085 013

Partie V

Expérience V.24.1. Page 272

Réactifs	
Observation vitale :	
Rouge neutre	Réf. MERCK : 1 01376
Bleu de méthylène	Réf. MERCK : 1 06045
Observations fixées et colorées :	
Vert de méthyle acétique :	
– Vert de méthyle	Réf. MERCK : 1 142 78
– Eau distillée	Réf. MERCK : 1 16754 9010
– Acide acétique	Réf. MERCK : 1 00063
Lugol (solution iodo-iodurée) :	
– Iode	Réf. MERCK : 1 04761
– Iodure de potassium	Réf. MERCK : 1 05043
– Eau distillée	Réf. MERCK : 1 16754 9010
Matériel	
Cristallisoir	Réf. PROLABO : 03 082 582
Tubes à essai	Réf. PROLABO : 00 883 922
Pipette	Réf. PROLABO : 09 085 013
Aiguille droite	Réf. PROLABO : 05 619 923
Aiguille lancéolée	Réf. PROLABO : 05 619 934
Lames	Réf. PROLABO : 05 632 298
Lamelles	Réf. PROLABO : 05 642 604
Eau distillée	Réf. MERCK : 1 16754 9010

Expérience V.24.2. Page 277

Réactifs	
Bleu coton	Réf. MERCK : 1 16316
KOH à 3 %	Réf. MERCK : 1 11586
Matériel	
Microscope	Réf. PROLABO : 13 694 072
Lames	Réf. PROLABO : 05 632 298
Lamelles	Réf. PROLABO : 05 642 604
Verre de montre	Réf. PROLABO : 09 446 090
Cristallisoir	Réf. PROLABO : 03 082 434

BIOSCIENCES ET TECHNIQUES

Expériences faciles et moins faciles en sciences biologiques

Une expérience est un extraordinaire outil pédagogique qui permet de redécouvrir ou de confirmer une théorie, et tout particulièrement en biologie de comprendre certains mécanismes naturels.

Mener à bon terme une expérience n'est pas toujours chose aisée. Outre sa réalisation pratique, elle doit être complétée par une analyse des résultats, une interprétation et une conclusion. L'ambition des auteurs de cet ouvrage est d'apporter tous les éléments de la réussite d'une manipulation.

Ce livre s'adresse à tous ceux que la biologie intéresse et plus particulièrement aux enseignants sans distinction de niveau. Certaines expériences décrites pourront être menées aussi bien par un jeune écolier que par un biologiste confirmé, seules l'interprétation et les conclusions seront différentes. L'enseignant pourra à sa guise modifier les procédures expérimentales de façon à les adapter à ses élèves ou à ses étudiants en fonction du programme et de la réflexion qu'il compte mener sur tel ou tel sujet. Des indications de difficulté de réalisation l'aideront dans cette tâche.

Une description très précise du matériel et des réactifs, fondée sur l'expérience professionnelle des auteurs, évitera au débutant de tâtonner et servira de base de données à l'expérimentateur confirmé.

La préoccupation de sécurité est présente à chaque page de l'ouvrage, les risques éventuels sont signalés pour chaque expérience. Les domaines de la biologie abordés sont : la chimie du vivant, la microbiologie, la biologie animale, la biologie végétale et la physiologie comportementale.

R. Perrier
T. Auffret van der Kemp
F. Zonszain



ISBN : 2-7040-0860-4